

Aus dem Zentrum für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Karl-Heinz Grzeschik

Arbeitsgruppe für Molekulare Analyse erblicher Erkrankungen
Leiterin: Prof. Dr. med. Manuela C. Koch

Zur Frage der Vererbung des Bardet-Biedl-Syndroms (BBS)

Molekulargenetische Analysen in den Genen *BBS1* und *BBS6*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von



Benjamin S. Frick aus Gießen

Marburg, 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
am 20.12.2007

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Rothmund
Referentin: Prof. Dr. med. Manuela C. Koch
Korreferent: Prof. Dr. med. Martin Eilers

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie und Begriffsbestimmung für das Bardet-Biedl-Syndrom	1
1.1.1	Klinische Merkmale des Bardet-Biedl-Syndroms (BBS)	2
1.1.2	Klinische Merkmale des McKusick-Kaufman-Syndroms (MKKS)	3
1.2	Die BBS-Gene und ihre Proteine	3
1.2.1	Mutationen in <i>BBS1</i> und <i>BBS6</i>	3
1.2.2	Vererbung	3
1.3	Fragestellung in der folgenden Studie	3
2	Material und Methoden	3
2.1	Material	3
2.1.1	Geräte und Zubehör	3
2.1.2	Chemikalien	3
2.2	Medien und Standardlösungen	3
2.2.1	DNA-Extraktion	3
2.2.2	Gelelektrophorese	3
2.2.3	Sonstige	3
2.2.4	Enzyme und DNA-Längenstandards	3
2.2.4.1	Enzyme	3
2.2.4.2	DNA-Längenstandards	3
2.2.5	PCR-Reagenzien	3
2.2.6	Ladepuffer	3
2.2.7	Fertigsysteme (Kits) zur Sequenzierung	3
2.2.8	Oligonukleotide	3
2.2.8.1	Oligonukleotide für <i>BBS1</i>	3
2.2.8.2	Oligonukleotide für <i>BBS6</i>	3
2.3	Software und Datenbanken	3
2.3.1	Software	3
2.3.2	Versuchsplanung und Ergebnisverwaltung	3
2.4	Experimentelle Methoden für die molekulargenetischen Analysen in <i>BBS1</i> und <i>BBS6</i>	3
2.4.1	DNA-Präparation aus Blutleukozyten	3
2.4.2	DNA-Konzentrationsbestimmung	3
2.4.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	3
2.4.3.1	PCR-Optimierung	3

2.4.4	Restriktionsspaltungen zum p.M390R-Nachweis in <i>BBS1</i> Exon 12 und zum p.R517C-Nachweis in <i>BBS6</i> Exon 6	3
2.4.5	Gelelektrophorese	3
2.4.5.1	Agarose-Gelelektrophorese	3
2.4.5.2	Fotodokumentation	3
2.4.5.3	Single-strand conformational analysis (SSCA)	3
2.4.5.4	Färbung mit Silbernitrat	3
2.4.6	Sequenzanalyse	3
3	Patienten und Kontrollpersonen	3
3.1	Patienten	3
3.2	Kontrollen	3
3.3	Kasuistik der Familie 2034	3
3.3.1	Familienanamnese	3
3.3.2	Kasuistik des Patienten 2192	3
3.3.3	Gegenüberstellung der Geschwister 2192 und 2185	3
4	Ergebnisse	3
4.1	Molekulargenetische Analysen im <i>BBS1</i> -Gen	3
4.1.1	Genstruktur von <i>BBS1</i>	3
4.1.2	Genotypisierung der Punktmutation 1779T → G in Exon 12	3
4.1.2.1	Genotyp- und Allelfrequenzen bei Patienten mit BBS und Kontrollpersonen	3
4.2	Molekulargenetische Analysen im <i>BBS6</i> -Gen	3
4.2.1	Genstruktur von <i>BBS6</i>	3
4.2.2	SSC-Analyse in <i>BBS6</i>	3
4.2.2.1	Exon 3	3
4.2.2.1.1	Primerkombination Ex3a 89F / 328R	3
4.2.2.1.2	Primerkombination Ex3b 23F / 386R	3
4.2.2.1.3	Primerkombination Ex3c 124F / 419R	3
4.2.2.1.4	Primerkombination Ex3d 62F / 400R	3
4.2.2.1.5	Primerkombination Ex3e 83F / 369R	3
4.2.2.2	Exon 4	3
4.2.2.2.1	Primerkombination Ex4 146F / 431R	3
4.2.2.3	Exon 5	3
4.2.2.3.1	Primerkombination Ex5F / Ex5R	3
4.2.2.4	Exon 6	3
4.2.2.4.1	Primerkombination Ex6a 72F / 404R	3

4.2.2.4.2	Primerkombination Ex6b 103F / 395R	3
4.2.2.4.3	Primerkombination Ex6c 63F / 348R	3
4.2.3	Zusammenfassung der SSCA-Ergebnisse von <i>BBS6</i>	3
4.2.4	Sequenzanalysen im <i>BBS6</i> -Gen	3
4.2.4.1	Punktmutation p.Y37C	3
4.2.4.2	Punktmutation p.I178I	3
4.2.4.3	Punktmutation p.R517C	3
4.2.4.3.1	Genotypisierung der Punktmutation p.R517C in Exon 6 mit der Restriktions- endonuklease <i>NspI</i>	3
4.2.4.4	Punktmutation p.G532V	3
5	Diskussion	3
5.1	Methodendiskussion	3
5.1.1	Die SSC-Analyse als Screeningmethode für Sequenzvarianten	3
5.1.2	Direkte Sequenzanalyse als Alternative zur SSC-Analyse	3
5.2	Klinische und epidemiologische Diskussion	3
5.2.1	Schwierigkeiten der klinischen Diagnose des Bardet-Biedl-Syndroms	3
5.2.2	Konsanguinität als Ursache gehäuferten Auftretens des Bardet-Biedl-Syndroms in bestimmten Populationen	3
5.3	Mutationen in den Genen <i>BBS1</i> und <i>BBS6</i>	3
5.4	Molekulargenetische Ursachen, die zur Ausprägung des Bardet-Biedl-Syndroms führen	3
5.5	Erkenntnisse für die genetische Beratung betroffener BBS-Familien	3
6	Zusammenfassung	3
7	Abkürzungen und Symbole	3
7.1	Abkürzungen	3
7.2	Symbole	3
7.2.1	Stammbaumsymbole	3
7.2.2	Symbole zur Beschreibung des Genotyps	3
8	Literaturverzeichnis	3
9	Anhang	3
9.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer	3
9.2	Danksagung	3

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Begriffsbestimmung für das Bardet-Biedl-Syndrom

Das Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) ist eine multisystemische, autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, welche durch die Kardinalsymptome Retinitis pigmentosa, postaxiale Polydaktylie, Adipositas, Hypogonadismus und Nierenfehlbildungen sowie mentale Retardierung charakterisiert ist. In seiner phänotypischen Ausprägung besitzt das Syndrom eine inter- und intrafamiliäre Variabilität. Erstmals wurde das BBS von dem französischen Arzt George Bardet im Jahr 1920 und dem österreichischen Pathologen und Endokrinologen Artur Biedl im Jahr 1922 beschrieben (Bardet 1920; Biedl 1922).

Die Häufigkeiten, mit der das BBS auftritt, unterscheiden sich deutlich in verschiedenen Bevölkerungsgruppen. Die höchsten Prävalenzraten bei Geburt werden bei Beduinenvölkern Kuwaits und in einer isolierten Neufundlandpopulation beobachtet (Farag and Teebi 1989; Green et al. 1989; Teebi 1994). Innerhalb der kaukasischen Population, in der das BBS relativ selten auftritt, wird die höchste Prävalenz für Dänemark beschrieben (Bruhl et al. 2001; Katsanis 2004). Zahlen für Deutschland liegen nicht vor (Tabelle 1-1).

Tabelle 1-1: Prävalenz des BBS in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen

Population	Prävalenz	Literatur
Nordamerika und Europa	1:140.000 – 160.000	Katsanis 2004
Dänemark	1:59.000	Bruhl et al. 2001
Kuwait	1:17.000	Farag and Teebi 1989
Beduinenvölker	1:13.500	Teebi 1994
Neufundland	1:13.000	Green et al. 1989

Postaxiale Polydaktylien, Hydrometrokolpos (Ödembildung im Bereich des utero-vaginalen Überganges infolge von Atresien und Stenosen) und angeborene Herzfehler kennzeichnen das klinische Erscheinungsbild des McKusick-Kaufman-Syndroms (MKKS). Die amerikanischen Genetiker Victor A. McKusick und Robert L. Kaufman konnten nachweisen, dass diese drei Symptome zusammen autosomal-rezessiv vererbt werden (McKusick et al. 1964; Kaufman et al. 1972).

Postaxiale Polydaktylien und Hydrometrokolpos sind sowohl bei einzelnen BBS-Patienten, als auch bei MKKS-Patienten in Erscheinung getreten (David et al. 1999). Phänotypische Überlappung beider Syndrome ließ eine Verbindung bei der Syndromentstehung vermuten. Tatsächlich konnten bei MKKS- und bei BBS-Patienten Mutationen in dem *BBS6*-Gen (*MKKS*) gefunden werden (Katsanis et al. 2000).

Differentialdiagnostisch abzugrenzen von den beiden oben genannten Syndromen ist das von dem englischen Augenchirurgen John Zachariah Laurence und seinem Assistenten Robert Moon beschriebene Laurence-Moon-Syndrom (Laurence and Moon 1866). Gemeinsamkeiten zeigen sich in den Symptomen wie Retinitis pigmentosa, Hypogonadismus und mentale Retardierung. Eine Zeit lang ging man davon aus, dass die von Laurence und Moon und von Bardet und Biedl beschriebenen Syndrome identisch sind. Man vergab daher die übergeordnete Bezeichnung Laurence-Moon-Bardet-Biedl-Syndrom (LMBBS) (Solis-Cohen and Weiss 1925). Da aber weder Adipositas noch Polydaktylie bei dem Laurence-Moon-Syndrom vorkommen, hat man diese Nomenklatur wieder verlassen und betrachtet beide Syndrome getrennt (Schachar and Maumenee 1982). Das Laurence-Moon-Syndrom wird autosomal-rezessiv vererbt (Farag and Teebi 1988). Das verantwortliche Gen ist nicht bekannt. In der vorliegenden Studie wird das Laurence-Moon-Syndrom nicht besprochen.

1.1.1 Klinische Merkmale des Bardet-Biedl-Syndroms (BBS)

Entsprechend den Häufigkeiten des Auftretens klinischer Merkmale beim BBS wurden Haupt- und Nebenkriterien definiert (Tabelle 1-2). Sie sollen helfen, die klinische Diagnose zu präzisieren (Beales et al. 1999).

Obwohl in den letzten 10 Jahren neue Erkenntnisse zu der Erkrankung BBS gewonnen wurden, basiert die Diagnose auch heute noch wesentlich auf den klinischen Symptomen. Da die Krankheitszeichen sehr unterschiedlich sein können, ist die Diagnose manchmal nicht sicher zu stellen. Vier Hauptkriterien alleine oder drei Hauptkriterien und zwei Nebenkriterien sollten erfüllt sein, um die klinische Diagnose BBS in Erwägung zu ziehen. Zu beachten ist, dass einige Symptome wie z.B. die Retinitis pigmentosa, Nierenerkrankungen in Folge von Nierenfehlbildungen oder auch Adipositas altersabhängig auftreten und sich teilweise erst im jugendlichen Alter manifestieren. Beim Verdacht auf das Vorliegen eines Bardet-Biedl-Syndroms bei einem Kind sind dementsprechend regelmäßige Kontrolluntersuchungen angezeigt (Beales et al. 1999).

Tabelle 1-2: Klinische Merkmale des BBS eingeteilt in Haupt- und Nebenkriterien (Beales et al. 1999). Die Klammern geben die Häufigkeiten des Auftretens bei BBS-Patienten an.

Hauptkriterien		Nebenkriterien
Retinitis pigmentosa	(93%)	Sprachverzögerung
Polydaktylie	(90%)	Entwicklungsverzögerung
Adipositas	(72-90%)	Koordinationsstörungen
Mentale Retardierung	(60%)	Schielen / Linsentrübung / Astigmatismus
Hypogonadismus beim Mann	(90%)	Taubheit
Nierenfehlbildungen	(90%)	Zahnstellungsanomalien
		Hyper- / Hypodontismus
		Brachydaktylie
		Syndaktylie
		Diabetes mellitus
		Diabetes insipidus
		Herzfehler
		Leberfunktionsstörungen

1.1.2 Klinische Merkmale des McKusick-Kaufman-Syndroms (MKKS)

MKKS wurde erstmals bei konsanguinen amischen und muslimischen Familien beschrieben. Klinische Hauptmerkmale des McKusick-Kaufman-Syndroms sind postaxiale Polydaktylien (PAP), Hydrometrokolpos und angeborene Herzfehler (Stone et al. 2000). Diese Merkmale sind manchmal sonografisch schon pränatal zu beobachten (Gaucherand et al. 2002).

Häufig wird MKKS bei Kleinkindern diagnostiziert. Eine Studie an neun ursprünglich als MKKS diagnostizierten Patienten zeigte, dass die zu frühe Festlegung auf dieses Syndrom zu Fehldiagnosen führen kann. Alle neun Patienten entwickelten im weiteren Verlauf ihres Lebens die Symptome Adipositas und Retinitis pigmentosa, welche Kardinalsymptome des BBS sind (David et al. 1999).

1.2 Die BBS-Gene und ihre Proteine

Durch Kopplungsanalysen bei Familien mit mehreren Betroffenen konnten inzwischen acht BBS-Gene lokalisiert und charakterisiert werden (*BBS1-BBS8*) (Tabelle 1-3). Studien an klinisch diagnostizierten BBS-Patienten, die keine Kopplung zu den bekannten BBS-Genen aufweisen, deuten darauf hin, dass mindestens ein weiterer Genlocus existiert (Ansley et al. 2003).

Tabelle 1-3: Die charakterisierten BBS-Gene

Gen	Position	Proteinmotiv / Funktion	Zelluläre Lokalisation	OMIM	Literatur
<i>BBS1</i>	11q13	β-Propeller	nicht bekannt	209901	Myktytn et al. 2002
<i>BBS2</i>	16q21	β-Propeller	nicht bekannt	606151	Nishimura et al. 2001
<i>BBS3</i>	3p13	ARL6	Zellmembran	600151	Chiang et al. 2004
<i>BBS4</i>	15q23	OGT	perizentrioläre Region	600374	Myktytn et al. 2001
<i>BBS5</i>	2q31	Biogenese von Zilien und Flagellen	perizentrioläre Region	603650	Li et al. 2004
<i>BBS6</i>	20p12	Chaperone	nicht bekannt	604896	Katsanis et al. 2000
<i>BBS7</i>	4q32	β-Propeller	nicht bekannt	607590	Badano et al. 2003
<i>BBS8</i>	14q31	TTC8	perizentrioläre Region	608132	Ansley et al. 2003

ARL6 = ADP-ribosylation factor-like-6, OGT = O-N-Acetylglucosamintransferase, TTC8 = tetratricopeptid-repeat-domain 8

Das auf Chromosom 11q13 liegende *BBS1*-Gen ist von besonderer Bedeutung. Bei etwa 14% der Betroffenen findet sich in Exon 12 von *BBS1* eine Mutation, die einen Aminosäureaustausch an der Stelle 390 in dem von *BBS1* codierten Protein verursacht. An Stelle von Methionin (M) befindet sich bei Trägern der Mutation Arginin (R). Das BBS1-Protein wird ubiquitär exprimiert und lässt sich in fötalem Gewebe, der Retina, in den Testes, sowie im Fettgewebe nachweisen. Die Funktion von BBS1 ist nicht bekannt (Myktytn et al. 2002).

BBS6 und *MKKS* sind unterschiedliche Bezeichnungen für das gleiche Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 20. Das McKusick-Kaufman-Syndrom wird durch Mutationen in *BBS6* verursacht. Zusätzlich werden Mutationen in *BBS6* (*MKKS*) auch bei 4-7% aller BBS-Patienten gefunden (Myktytn et al. 2002). Eine Mutation, die so häufig ist wie die p.M390R-Mutation in *BBS1*, existiert in *BBS6* nicht. Das BBS6-Protein zeigt eine hohe Sequenzhomologie zu den Proteinen aus der Chaperoninfamilie Typ II. Die größte Homologie wurde mit der alpha-Untereinheit des Thermosoms, einem Enzym aus dem Archaeobakterium *Thermoplasma acidophilum*, nachgewiesen (Stone et al. 2000).

Aufmerksamkeit erlangte *BBS1* durch die starke Ähnlichkeit seiner Proteinsequenz mit dem von *BBS2* codierten Protein. Auch die Expressionsmuster von *BBS1*, *BBS2*, *BBS4* und *BBS6* ähneln sich. Hinweise zu einer kaskadenartigen Verbindung der BBS-Proteine existieren nicht.

Da es sich bei dem BBS6-Protein um ein Chaperon handelt, wurde der Vermutung nachgegangen, dass auch die anderen BBS-Proteine der Gruppe der Chaperone angehören. Diese Spekulation konnte nicht bewiesen werden (Mykytyn et al. 2002).

Die weiteren BBS-Gene werden zur Vollständigkeit im Folgenden kurz beschrieben. Das Augenmerk dieser Studie liegt aber auf den Genen *BBS1* und *BBS6*.

Die Funktionen der Proteine BBS2 und BBS7 sind nicht bekannt. Es konnte ein Bereich nachgewiesen werden, der bei den Proteinen BBS1, BBS2 und BBS7 identisch ist. Dieser Bereich soll für die Faltung dieser drei Proteine entsprechend einem β -Propeller-Motiv verantwortlich sein (Badano et al. 2003).

Das von *BBS3* codierte Protein zeigt eine starke Sequenzhomologie mit dem ADP-ribolysation-factor-like-6, kurz ARL6, einem kleinen G-Protein der Ras-Familie. Die G-Proteine der Ras-Familie sind an der Regulation der Genexpression beteiligt (Chiang et al. 2004).

Das BBS4-Protein zeigt die größte Homologie mit der O-N-Acetylglucosamin-transferase. Sie soll mitverantwortlich bei Insulinresistenzen sein und eine Rolle bei der Ausprägung des Diabetes mellitus Typ I spielen (Mykytyn et al. 2001). Ein Studie an BBS4-Knockout-Mäusen hat gezeigt, dass Fehlfunktionen der Zilienanordnung und Funktion zilientragender Zellen, wie die Fotorezeptorzellen oder verschiedener Zellen des Hodens männlicher Mäuse, zu Hauptsymptomen vom BBS führen (Mykytyn and Sheffield 2004).

Dem BBS5-Protein konnte die Mitwirkung bei der Biogenese von Zilien und Flagellen nachgewiesen werden (Li et al. 2004). Das BBS8-Protein ist ein Tetratricopeptid-Protein und an der Funktion der Basalkörper und an der Ciliogenese beteiligt (Ansley et al. 2003).

1.2.1 Mutationen in *BBS1* und *BBS6*

BBS1 besteht aus 17 Exons. Insgesamt wurden bis jetzt etwa 50 Mutationen bei Patienten mit BBS gefunden. Es überwiegen Punktmutationen, insbesondere Aminosäureaustauschmutationen und Stoppmutationen. Die häufigste Mutation p.M390R liegt in Exon 12 (Tabelle 1-4).

Tabelle 1-4: Mutationen im *BBS1*-Gen in einer kaukasischen Population (Beales et al. 2003)¹

Mutation	Exon	Anzahl mutanter Allele*	Literatur
p.H35R	2	1	1
p.K53E	4	1	1
p.L75fsX98	4	1	1
p.Y113X	4	1	1
p.Q128X	4	1	1
p.R146X	5	4	1
p.D148N	5	4	1
p.E234K	8	1	1
g.IVS9-3C>G	9	2	1
p.Y285fsX288	10	3	1
p.Q291X	10	1	1
p.G305S	10	4	1
p.389delI	12	1	1
p.M390R	12	74	1
p.R429X	13	1	1
p.Y434S	13	1	1
p.R440X	13	2	1
g.IVS13-2A>G	13	2	1
p.R483X	14	1	1
p.L503H	15	1	1
p.L505fsX556	15	1	1
p.L518Q	15	1	1
p.L548fsX579	16	1	1
p.E549X	16	1	1

* = Es wurden 259 BBS-Patienten analysiert. Homozygote Mutationen wurden als zwei Allele gezählt.

g = Nomenklatur bezieht sich auf die genomische Sequenz (Acc. No.: AF503941)

p = Nomenklatur bezieht sich auf das Protein

BBS6 besitzt 6 Exons. Exon 1 und Exon 2 sind nicht codierend. Das Startkodon ATG liegt in Exon 3. Insgesamt konnten bisher etwa 40 Mutationen bei Patienten mit BBS gefunden werden. Hauptsächlich sind es Punktmutationen in Form von Aminosäureaustauschmutationen und Stoppmutationen. Mutationen wurden in allen codierenden Exons gefunden (Tabelle 1-5).

Tabelle 1-5: Mutationen im *BBS6*-Gen

Mutation	Exon	Anzahl mutanter Allele*	Literatur
p.H84Y	3	2	1
p.A242S	3	3	1
p.Y37C	3	3	1
c.280_281delT	3	2	2
c.429_430delCT;433_434delAG	3	3	2, 3
p.L227P	3	1	2
p.T57A	3	1	2
p.G52D	3	1	3
p.Y264X	3	1	3
p.I32M	3	1	4
p.S235P	3	1	4
p.Q147X	3	1	4
p.D285A	3	1	4
c.431_441delTTAGTAGTACT	3	2	4
c.876_877insCCTG	3	1	4
p.R155L	3	1	4
p.G345E	4	2	4
p.I339V	4	1	4
c.1215_1216delGG	5	1	1
p.R518H	6	1	4
p.C499S	6	1	4
p.S511A	6	1	4
p.R517C	6	1	5
p.G532V	6	1	5

* = Es wurden 27 BBS-Patienten analysiert. Homozygote Mutationen wurden als zwei Allele gezählt.

p = Nomenklatur bezieht sich auf das Protein

c = Nomenklatur bezieht sich auf die cDNA

g = Nomenklatur bezieht sich auf die genomische Sequenz (Acc. No.: AF221993.1)

Literatur: 1) Stone et al. 2000

2) Katsanis et al. 2000

3) Slavotinek et al. 2000

4) Beales et al. 2001

5) Andersen et al. 2005

1.2.2 Vererbung

Durch die Aufklärung der molekulargenetischen Ursachen des BBS muss man heute zwei Möglichkeiten der Vererbung diskutieren. Diese Möglichkeiten sollen exemplarisch im folgenden Abschnitt aufgezeigt werden.

1. autosomal-rezessiver Erbgang



	<i>BBS1</i>	<i>BBSx</i>
BBS-Patient 1		-
BBS-Patient 2		-

Abbildung 1-1: Zwei Mutationen in einem Gen, die in homozygoter (BBS-Patient 1) oder compound heterozygoter (BBS-Patient 2) Form vorliegen können.

2. digener Erbgang : autosomal-rezessiver Erbgang mit zusätzlicher Mutation in einem weiteren BBS-Gen





	<i>BBS1</i>	<i>BBSx</i>
BBS-Patient 3		
BBS-Patient 4		

Abbildung 1-2: Das Syndrom wird autosomal-rezessiv vererbt. Die zusätzliche dritte Mutation beeinflusst die Penetranz und/oder Expressivität.

In diesem Zusammenhang wird auch häufig von einem triallelischen Erbgang gesprochen. Dieser Erbgang beschreibt das Vorhandensein von insgesamt 3 mutanten Allelen in zwei verschiedenen BBS-Genen. Die bekannten BBS-Gene sind unterschiedlich häufig am triallelischen Erbgang beteiligt. Der triallelische Erbgang konnte bisher für alle BBS-Gene gezeigt werden, besonders häufig sind die Gene *BBS4* und *BBS6* involviert, am seltensten *BBS1* (Katsanis 2004).

1.3 Fragestellung in der folgenden Studie

Das Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) ist eine in Europa selten auftretende, multisystemische Erkrankung, die in ihrer phänotypischen Ausprägung eine inter- und intrafamiliäre Variabilität aufweist. Die Diagnose wird klinisch gestellt. Dazu wurden Haupt- und Nebenkriterien definiert, die helfen sollen die Diagnose zu präzisieren. Vier Hauptkriterien alleine oder drei Hauptkriterien und zwei Nebenkriterien sollten erfüllt sein, um die klinische Diagnose BBS in Erwägung zu ziehen (Beales et al. 1999).

Als Ursache für die Ausprägung des autosomal-rezessiv vererbten Bardet-Biedl-Syndroms (BBS) werden Mutationen in den bisher bekannten acht BBS-Genen (*BBS1-BBS8*) verantwortlich gemacht. Von besonderer Bedeutung ist *BBS1*. Hier kann mit einer Allelfrequenz von 14% bei BBS-Patienten die p.M390R-Mutation nachgewiesen werden. Das Ziel bzw. die Aufgabe dieser Studie war es, die Genotypisierung von DNA-Proben von BBS-Patienten für die am häufigsten auftretende p.M390R-Mutation unabhängig von einer Sequenzanalyse durchzuführen. Die Häufigkeit der p.M390R-Mutation im vorhandenen Patientengut sollte zeit- und arbeitsunaufwendig, sowie kostengünstig bestimmt werden.

Neben Patienten mit Mutationen in nur einem der BBS-Gene (monogen) konnten Patienten mit Mutationen in zwei verschiedenen BBS-Genen (digen) gezeigt werden (Katsanis 2004). Besonders häufig werden Mutationen in *BBS6* bei digen betroffenen BBS-Patienten gefunden. Das *BBS6*-Gen der BBS-Patienten des vorhandenen Patientenkollektivs sollte auf Sequenzvarianten analysiert werden. Dazu ist es notwendig das *BBS6*-Gen mit geeigneten Primerpaaren zu amplifizieren, sodass die PCR-Produkte eine für die single-strand conformational analysis (SSCA) optimale Größe erhalten. Die bei der SSC-Analyse auffälligen PCR-Produkte sollten in einem weiteren Schritt einer Sequenzanalyse unterzogen werden. Die BBS-Patienten des vorhandenen Patientenguts sollten auf eine digene Trägerschaft der p.M390R-Mutation und einer weiteren Mutation in *BBS6* überprüft werden.

Die Vorhersagbarkeit über die mögliche Vererbung und des wiederholten Auftretens des BBS spielt eine zentrale Rolle in der genetischen Beratung von Betroffenen und deren Eltern. Fundierte Aussagen darüber können erst dann gemacht werden, wenn die bekannten BBS-Gene auf Mutationen bei BBS-Patienten analysiert wurden und Gesetzmäßigkeiten, die zur Ausprägung des BBS, insbesondere bestimmter Phänotypen führen, formuliert wurden. Die Erkenntnisse dieser Studie sollten auf ihren Nutzen in der genetischen Beratung betroffener BBS-Familien getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Zubehör

Autoklav

ABI Prism 377 DNA-Sequencer

ABI Prism 310 Genetic Analyzer

Einmachfolie (Zellglas)

Hamilton Spritze

Hoefer SE 600 Elektrophorese Unit

Gössner, Hamburg

Applied Biosystems, USA

Applied Biosystems, USA

Folia Paper, Wendelstein

Hamilton, Schweiz

Amersham, Freiburg

Reaktionsgefäße:

Falcon Tubes (50 ml)

MicroAmp Reaction Tubes

Micro Test Tubes (1,5 ml)

MicroTubes (0,5 ml)

Falcon, USA

Perkin Elmer Cetus, USA

Eppendorf, Hamburg

Sarstedt, Nümbrecht

Schüttelinkubator G25

Thermoblock Techne DB 3

New Brunswick Scientific, USA

Kobe, Marburg

Thermocycler:

GeneAmp PCR System 9600

TRIO Thermoblock TB1

Applied Biosystems, USA

Biometra, Göttingen

UV-Transilluminator UVT-40M

Vortexer Reax 2000

Herolab, Wiesloch

Heidolph, Hamburg

Präzisionswaage 2254

Sartorius, Göttingen

Wasserbäder

Typ 3042

Typ 1083

Typ M3

Köttermann, Hänigsen

GFL, Burgwedel

Lauda, Königshofen

Zentrifugen:

Sorvall RT 6000B

Sorvall GLC-2B

Eppendorf 5415 R Kühltzentrifuge

Biofuge 13

DuPont, Dreieich

DuPont, Dreieich

Eppendorf, Hamburg

Heraeus, Hanau

2.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Sigma (München), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Riedel-de-Haen (Seelze), Roche Diagnostics (Mannheim), Serva (Heidelberg), FMC BioProducts (USA).

2.2 Medien und Standardlösungen

Zur Sterilisation wurden Medien und Lösungen 30 min. bei 121°C autoklaviert. Falls nicht anders angegeben, wurde für alle Puffer und Lösungen Aqua dest. benutzt.

2.2.1 DNA-Extraktion

RCLB-Puffer	10 mM Tris 5 mM MgCl ₂ 10 mM NaCl pH 7,6 mit HCl einstellen
SE-Puffer	75 mM NaCl 25 mM EDTA pH 8,0 mit NaOH einstellen
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0 mit 1 M Salzsäure einstellen
DNA-Extraktionspuffer	100 mM Tris 100 mM EDTA 1% (w/v) SDS pH 9,0 mit NaOH einstellen

2.2.2 Gelelektrophorese

5 x TBE-Puffer	0,45 M Tris 0,45 M Borsäure 10 mM EDTA
10 x TPE-Puffer	80 mM Tris 20 mM EDTA pH 8,3 mit Phosphorsäure (85%) einstellen

2.2.3 Sonstige

APS	10% (w/v) Ammoniumpersulfat in H ₂ O
-----	--

2.2.4 Enzyme und DNA-Längenstandards

2.2.4.1 Enzyme

Die Restriktionsenzyme *Ava*II und *Nsp*I wurden von der Firma New England Biolabs Inc, Frankfurt a.M. bezogen.

2.2.4.2 DNA-Längenstandards

100 bp DNA Leiter	Gibco BRL, Eggenstein
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
λ-DNA, <i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III geschnitten	Gibco BRL, Eggenstein

2.2.5 PCR-Reagenzien

10 x PCR-Puffer	Amersham, Freiburg
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Amersham, Freiburg
MgCl ₂ (25 mM)	Amersham, Freiburg
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
Betaine 5 M	Sigma, München

2.2.6 Ladepuffer

6 x Agarosegel-Ladepuffer	15% (w/v) Ficoll 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol
PAA-Gelladepuffer	95% Formamid 20 mM EDTA (pH 7,4) 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol

2.2.7 Fertigsysteme (Kits) zur Sequenzierung

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
ABI PRISM Big Dye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit	ABI, Applied Biosystems, USA

2.2.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Roth (BRD) in *desalted* Qualität bezogen. Die Referenzsequenzen stammen von der Gendatenbank der Universität Kalifornien (<http://genome.ucsc.edu>).

2.2.8.1 Oligonukleotide für *BBS1*

Die für die Restriktionsspaltung mit *AvaII* im Exon 12 von *BBS1* verwendeten Primer sind in Tabelle 2-1 aufgelistet. Bei gesunden Probanden entsteht ein Produkt mit der Länge von 300 bp. Heterozygote Träger zeigen drei Fragmente mit den Längen 300 bp, 196 bp und 104 bp. Homozygot erkrankte Patienten weisen zwei Fragmente mit den Längen 196 bp und 104 bp auf.

Tabelle 2-1: Die für die Restriktionsspaltung in Exon 12 von *BBS1* mit *AvaII* verwendeten Oligonukleotide (Acc. No.: AF503941)

Exon	Primer	Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Verwendung	Produkt	Annealing Temperatur
12	forward	Exon 12 89f	tatttcagagcagcgattc	<i>AvaII</i>	300 bp	60°C
12	reverse	Exon 12 388r	atgcttcattccacctct	<i>AvaII</i>		

2.2.8.2 Oligonukleotide für *BBS6*

Alle Primer sind selbst gelegt. Exon 3 und Exon 6 mussten aufgrund ihrer Größe unterteilt werden.

Tabelle 2-2: Die für die Mutationssuche in *BBS6* verwendeten Oligonukleotide (Acc. No.: AF221993.1)

Exon	Primer	Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Vwdg.	Produkt	Ann. Temp.
3a	forward	BBS6 Ex3a 89F	GGTCTTCACTAGTTACCACTG	PCR	240 bp	61°C
3a	reverse	BBS6 Ex3a 328R	GTGTGACCAAAAGGTGACTG	PCR		
3b	forward	BBS6 Ex3b 23F	CTGAGAGAGTCAGGACCACAC	PCR	364 bp	62°C
3b	reverse	BBS6 Ex3b 386R	ATTCGACAACCACAGGTCTC	PCR		
3c	forward	BBS6 Ex3c 124F	AAATAAACATCTTTTGTAGTCTTTGC	PCR	263 bp	62°C
3c	reverse	BBS6 Ex3c 419R	TCCCAGGTAATACAGTGGAATC	PCR		
3d	forward	BBS6 Ex3d 62F	GCTCACCAGAAAGGAAACAG	PCR	358 bp	60°C
3d	reverse	BBS6 Ex3d 400R	TTAAGCAGCTGGTCCAAGAC	PCR		
3e	forward	BBS6 Ex3e 83F	TCAAGGTGGCACTCTTTTG	PCR	313 bp	52°C
3e	reverse	BBS6 Ex3e 369R	GATTTATTAAGTGAAGAGGC	PCR		
4	forward	BBS6 Ex4 146F	Tgtttgtctccacttttgcct	PCR	286 bp	52°C
4	reverse	BBS6 Ex4 431R	Agtgactaatctccctcagc	PCR		
5	forward	BBS6 Ex5 F*	Gcaccacacaagttttgttc	PCR	378 bp	62°C
5	reverse	BBS6 Ex5 R*	Ccaatacatgcaccctgaa	PCR		
6a	forward	BBS6 Ex6a 72F	Cagaccccaaatataatgaaag	PCR	333 bp	60°C
6a	reverse	BBS6 Ex6a 404R	ATCTGGCCAGTTAGCAACAC	PCR		
6b	forward	BBS6 Ex6b 103F	GGCTCTTTAGAACATGATGGAG	PCR, <i>NspI</i>	293 bp	57°C
6b	reverse	BBS6 Ex6b 395R	GCTGTCTCTACAACCACCTG	PCR, <i>NspI</i>		
6c	forward	BBS6 Ex6c 63F	TCTTTAGAAGCACACGTCGTC	PCR	286 bp	60°C
6c	reverse	BBS6 Ex6c 348R	Aaatgtagaacagggttttg	PCR		

Kleinbuchstaben kennzeichnen die intronsische Lage der Primer, Großbuchstaben ihre Lage im Exon.

2.3 Software und Datenbanken

2.3.1 Software

Textverarbeitung	Word 2000, Microsoft
Datenverwaltung	Excel 2000, Microsoft Access 2000, Microsoft
Literaturverwaltung	Endnote 6.0, Niles Software
Grafik	PowerPoint, Microsoft Photoshop 6.0, Adobe
Sequenzanalyse	Sequencher 4.1, Gene Codes

2.3.2 Versuchsplanung und Ergebnisverwaltung

Zur Versuchsplanung, der Verwaltung der Ergebnisse, sowie der Dokumentation aller durchgeführten Analysen stand keine geeignete Datenbank zur Verfügung. Ansprüche, die an solch eine Datenbank gestellt werden, sind gute Bedienbarkeit, leichte Wartung, Übersichtlichkeit, Zuverlässigkeit, effiziente Einbindung schon vorhandener Ergebnisse und die Möglichkeit flexibel auf anfallende Probleme oder Fragestellungen reagieren zu können. Zusätzlich sollte die Versuchsplanung automatisiert in die Dokumentation übergehen und es sollte nicht zuviel Zeit durch das Einarbeiten in unbekannte Programme verloren gehen. Gelöst werden konnte dies mit einer Access-Datenbank. Nicht vorhandene Funktionen wurden mit selbst programmierten Programmteilen ergänzt. So wurde z.B. die Datenbank um ein Modul zur Planung von PCRs und SSCAs erweitert. Auswertungen konnten über Abfragen leicht und schnell erstellt werden. Kontrollinstanzen der Programmteile halfen mit, die Fehleranzahl in der Dokumentation zu minimieren. Regelmäßige Sicherungen beugten einem Datenverlust vor. Der Zeitverlust, der durch die Gestaltung dieser Datenbank entstanden ist konnte durch die deutlich schnellere Versuchsplanung und Ergebnissauswertung mehr als wieder gut gemacht werden.

Tabelle 2-3: Übersicht der verwendeten Datenbanken aus dem Internet

Datenbank	Internetadresse
NCBI (National Center of Biotechnology Information)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
EMBL (European Molecular Biology Laboratory)	http://www.embl-heidelberg.de
UCSC – Genome Bioinformatics	http://genome.ucsc.edu
Rebase (Restriction Enzyme Database)	http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html
HGMP (Human Genome Mapping Project Resource Center)	http://www.hgmp.mrc.ac.uk
Webcutter 2.0	http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html
Expasy Molecular Biology Server	http://www.expasy.org
HUGO Nomenclature Committee	http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/

2.4 Experimentelle Methoden für die molekulargenetischen Analysen in *BBS1* und *BBS6*

Nach DNA-Gewinnung aus Blutleukozyten wurden die Exons des jeweiligen Gens mittels PCR einzeln amplifiziert. Danach erfolgte eine Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA). DNA-Proben, die hier ein Fragmentmuster zeigten, das von der Mehrheit aller Proben abwich, wurden erneut untersucht und bei wiederholbarer SSCA-Auffälligkeit sequenziert. Zum Nachweis der häufigen Mutationen p.M390R in *BBS1* Exon 12 und p.R517C in *BBS6* Exon 1 wurden Restriktionsendonukleasen eingesetzt.

2.4.1 DNA-Präparation aus Blutleukozyten

Zur Gewinnung genomischer DNA der Probanden wurde EDTA-Blut (frisch oder eingefroren) verwendet. 10 ml Blut wurden mit 20 ml Red Cell Lysis Buffer (RCLB) versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit lysieren die Erythrozyten im hypotonischen Puffer, die Leukozyten bleiben intakt und können durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt (10 min bei 3000 rpm, 4°C) sedimentiert werden. Das Pellet aus Leukozyten wurde in 5 ml SE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl SDS (10%) und 2,5 µl Proteinase K (10 mg/ml) wurde die Suspension bei 55°C 3h schüttelnd inkubiert. Danach wurden die abgebauten Proteinreste durch Zugabe von 2 ml NaCl (5 M) ausgefällt, und bei Raumtemperatur abzentrifugiert (10 min, 3000 rpm). Der DNA-haltige Überstand wurde mit 40 ml eiskaltem 95%igem Ethanol (EtOH) gefällt. Die DNA wird mit einem sterilen Glashaken entnommen, mit 70%igem EtOH gewaschen und in ca. 500 µl TE-Puffer über Nacht bei 4°C gelöst.

2.4.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA wurde mit einem Fotometer gemessen. DNA mit einer Dichte von 50 ng/µl besitzt bei 260 nm Wellenlänge eine Extinktion von 1. Die Konzentration der gemessenen DNA kann also folgendermaßen berechnet werden: $[\text{DNA } (\mu\text{g/ml})] = E_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor } (\mu\text{g/ml})$.

Die DNA wurde über einen Wellenlängenbereich von 200-300 nm gemessen. Der Quotient aus E_{260} und E_{280} ist ein Maß für die Verunreinigung der DNA mit Proteinen; er sollte zwischen 1,8 und 1,9 liegen.

2.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.4.3.1 PCR-Optimierung

Besondere Sorgfalt wurde auf die Auswahl der Primer verwendet. Der hierfür verwendete Dienst der Internetseite http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi Primer 3 erlaubt die Einstellung zahlreicher Parameter, die für die jeweilige Anwendung der Primer (PCR, Direktsequenzierung) optimiert werden können.

Die meisten Templates konnten mit geeigneten Primerpaaren bei Standardbedingungen amplifiziert werden. Die Annealing-Temperatur wurde für Spezifität und Ausbeute des PCR-Produktes optimiert.

2.4.4 Restriktionsspaltungen zum p.M390R-Nachweis in *BBS1* Exon 12 und zum p.R517C-Nachweis in *BBS6* Exon 6

Doppelsträngige DNA kann durch Restriktionsendonukleasen gespalten werden. Da die Sequenzspezifität der Restriktionsenzyme erheblich von Art und Konzentration der in der Reaktionslösung vorhandenen Ionen abhängt, wurde der vom Hersteller empfohlene Reaktionspuffer eingesetzt. Die Spaltung genomischer DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt, mit 1-5 Units des Enzyms pro 1 µg genomischer DNA. Die Inkubation erfolgte 1 – 2 h im Thermoblock bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur.

2.4.5 Gelelektrophorese

2.4.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 100 bp und 40 kb erfolgte in 0,8-2,5%igen Agarosegelen. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit Ladepuffer vermischt, um die Laufweite im Gel später abschätzen zu können.

2.4.5.2 Fotodokumentation

Agarosegele wurden vor dem Giessen mit Ethidiumbromid (EtBr) versetzt, um die DNA unter UV-Licht sichtbar machen zu können (2 µl der EtBr-Stammlösung (10 mg/ml) auf 100 ml des Agarosegels). Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert. Die Verwaltung und Auswertung der Bilder erfolgte mit E.A.S.Y.Rh3 Software (Herolab).

2.4.5.3 Single-strand conformational analysis (SSCA)

Zur Mutationssuche in den Kandidatengenomen wurde die Einzelstrang-Konformations-Analyse eingesetzt (SSCA). Dazu wird denaturierte, einzelsträngige DNA auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Im Gel nimmt die DNA durch Basenpaarung mit sich selbst komplexe Konformationen ein, die von der Nukleinsäuresequenz und der Temperatur abhängen. Schon eine einzige mutierte Base kann zu veränderten Laufeigenschaften des Fragments im Gel führen. Die Sensitivität der SSCA hängt dabei von der Länge der PCR-Produkte ab, die optimale Größe liegt zwischen 150 – 350 bp.

Das jeweilige Gen wurde aus genomischer DNA mit überlappenden PCR-Produkten amplifiziert. Diese wurden mit SSCA-Ladepuffer (formamidhaltig) versetzt, denaturiert und danach auf ein nicht-denaturierendes PAA-Gel (12%, 49:1) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 2 Temperaturen durchgeführt, 20°C und 10°C. Anschließend wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Die so gefärbten Gele wurden in Zellglas (Einmach-Folie) verpackt und getrocknet. Sie sind auf diese Weise dauerhaft haltbar. Die SSCA Bedingungen wurden für jedes einzelne PCR-Produkt optimiert: aufgetragene DNA-Menge, Spannung und Laufzeit wurden individuell variiert.

2.4.5.4 Färbung mit Silbernitrat

Bei der Silberfärbung lagern sich die positiv geladenen Silberionen an die negativ geladenen Phosphatreste der DNA an. Durch das in der Entwicklerlösung enthaltene Formaldehyd werden die Silberionen reduziert und anschließend mit Natriumcarbonat gefällt. Das Gel wird so lange in der Entwicklerlösung inkubiert, bis die Fragmente die gewünschte Farbintensität zeigen. Durch Einlegen des Gels in den Fixierer (Essigsäure) wird die Reaktion abgestoppt.

• 10% Ethanol	5 min
• 1% Salpetersäure	5 min
• H ₂ O	1 x kurz spülen
• Silbernitrat-Lösung	30 min
• H ₂ O	2 x gründlich spülen
• Entwickler	in der Lösung bewegen, bis sich Fragmente zeigen
• Fixierer	2 min
• H ₂ O	1 x 2 min spülen
• Konservierer	mindestens 30 min

Lösungen:

Silbernitrat-Lösung	12 mM AgNO ₃
Entwickler	0,14 M Na ₂ CO ₃ 0,038% Formaldehyd
Fixierer	10% Essigsäure
Konservierer	10% Ethanol 5% Glycerol

2.4.6 Sequenzanalyse

Zur Mutationsanalyse in BBS6 wurden ausgewählte DNA-Fragmente sequenziert, die in der SSCA ein auffälliges Muster boten und vom Laufverhalten der meisten anderen Proben abwichen. Zur Vorbereitung wurde das entsprechende PCR-Produkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Anschließend folgte der Ansatz für die Sequenzreaktion mithilfe des ABI PRISM Big Dye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit, um danach die Sequenzierung im automatischen Sequenziergerät ABI 310 durchzuführen.

Die Methode des Cycle Sequencing in der Sequenzreaktion folgt dem Prinzip des Kettenabbruch-Verfahrens nach Sanger (Sanger et al. 1977), wobei die *in vitro* DNA Polymerisation unter den Bedingungen einer PCR durchgeführt wird. Da man nur einen Primer verwendet, erfolgt die Anreicherung der DNA nicht potentiell, sondern linear. Neben Desoxynukleotiden eines gewöhnlichen PCR-Ansatzes, werden basenspezifisch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide zugegeben. Diese führen bei Einbau zu einem Kettenabbruch, sodass DNA-Einzelstrangfragmente verschiedener Länge entstehen, die entsprechend ihrer letzten Base präzise fluoreszenzmarkiert sind. Im Sequenziergerät wandern diese DNA-Einzelstränge durch eine Gelkapillare. Anhand der Fragmentlänge und dem Signal des Fluoreszenzmarkers erkennt das Gerät Position und Art der letzten Base des Fragments. Da im Ansatz DNA-Stränge jeder Länge des Templates von der ersten bis zur letzten Base vorhanden sind, kann man für jede Position ein spezifisches Basensignal erhalten.

Mit der angegliederten Software von ABI (Sequencher und Sequence Navigator) konnten die Ergebnisse graphisch dargestellt (Chromatogramm) und ausgewertet werden. Die zu analysierende DNA wurde dem Template einer anderen DNA-Probe gegenübergestellt, die in der SSCA das am häufigsten zu observierende und somit unauffällige Laufmuster zeigte. Beide wurden gleichzeitig auch mit der Referenzsequenz des Wildtyps verglichen, um gemeinsame Abweichungen festzustellen.

3 Patienten und Kontrollpersonen

Nahezu 80% des Patientengutes stammt von der Laienorganisation Pro Retina Deutschland e.V. bzw. deren Untergruppe „BBS“. Die übrigen Patienten wurden von niedergelassenen Ärzten und Kliniken an das Zentrum für Humangenetik in Marburg überwiesen. Alle Patienten, Eltern und Kontrollpersonen wurden über die Intention dieser Studie mit einem Informationsblatt aufgeklärt und ausschließlich nach Einverständniserklärung in die Studie aufgenommen.

Der Studienaufbau wurde von der Ethikkommission der Philipps-Universität in Marburg überprüft und anerkannt.

3.1 Patienten

Für diese Studie standen insgesamt 62 klinisch diagnostizierte BBS-Patienten, sowie ihre Familienmitglieder (39 Väter, 41 Mütter, 34 gesunde Geschwister, 8 erkrankte Geschwister) zur Verfügung (Tabelle 3-1). Keiner der Elternteile war betroffen. Unter den 62 Patienten befinden sich 27 Einzelkinder. Die restlichen 35 Patienten kommen aus 29 unterschiedlichen Familien, wobei neun Elternpaare mehr als ein betroffenes Kind hatten. Acht Familien stammen aus der Türkei. Die anderen Familien entstammen der kaukasischen Bevölkerungsgruppe. Sieben Elternpaare sind verwandt, darunter fünf türkische. Zum Zeitpunkt dieser Studie waren alle Patienten noch kinderlos.

Tabelle 3-1: Aufschlüsselung der Probanden zur molekulargenetischen Analyse in *BBS1* und *BBS6*

Probanden	klinische Diagnose	Anzahl	Anmerkung
Patienten	BBS	62	54 deutsche, 8 türkische BBS-Patienten
Geschwister	BBS	8	
Väter	kein Syndrom	39	
Mütter	kein Syndrom	41	
Geschwister	kein Syndrom	34	

3.2 Kontrollen

Als Kontrollgruppe dienten 100 anonymisierte DNA-Proben von nicht miteinander verwandten männlichen und weiblichen Personen der deutschen Population.

3.3 Kasuistik der Familie 2034

Die in dieser Studie beschriebene Kasuistik bezieht sich auf Informationen, die entweder durch den an alle Patienten verschickten Fragebogen oder durch die direkte Patientenbefragung und der körperlichen Untersuchung gewonnen wurden. Der Patient 2185 stellte sich im Rahmen der humangenetischen Beratung bei uns im Zentrum für Humangenetik in Marburg zusammen mit seiner Mutter 2191 vor. Weitere Mitglieder der Familie wurden von uns persönlich nicht gesehen, insbesondere auch nicht die Schwester 2185.

3.3.1 Familienanamnese

Die Familie stammt aus einem kleinen Ort an der Mosel. Bei der Erhebung des Stammbaums ergab sich, dass die Eltern 2190 und 2191 sowohl über die väterliche Linie, als auch über die mütterliche Linie Vettern 4. Grades sind. Die Eltern von 2191 sind wiederum über deren väterliche und mütterliche Linie Vettern 2. Grades (Abbildung 3-1). Zwei von drei Kindern sind am Bardet-Biedl-Syndrom erkrankt. Eine weitere Schwangerschaft der Mutter 2191 verlief mit Komplikationen, es kam zu einer Fehlgeburt. Weitere Erkrankungen dieser Familie sind nicht bekannt.

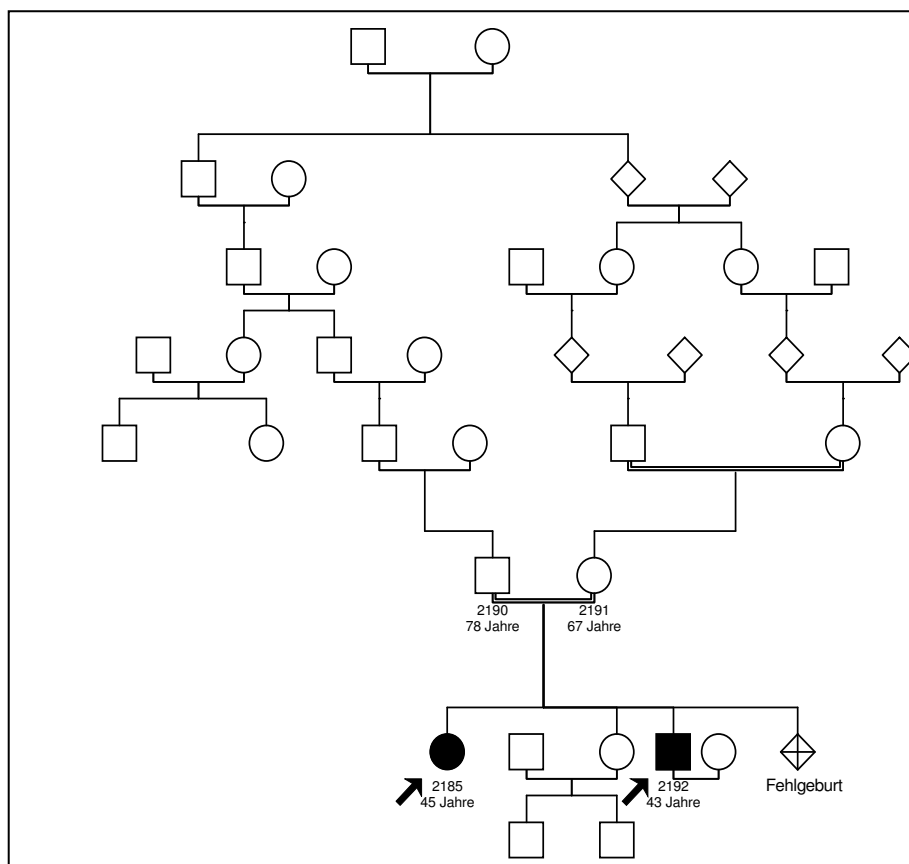


Abbildung 3-1: Stammbaum der Familie 2034. Deutlich werden die Verwandtschaftsverhältnisse, die hier mit doppelten Verbindungslinien kenntlich gemacht sind.

3.3.2 Kasuistik des Patienten 2192



Abbildung 3-2: Patient 2192. Mit einem BMI von 32 ist der Patient 2192 deutlich adipös.

Nach unkomplizierter Schwangerschaft wurde der Patient am **.**.1961 geboren. Sitzen und Laufen erlernte er den Meilensteinen entsprechend. 1962 wurde er wegen einer Hirschrung-Erkrankung, sowie an der Polydaktylie im Mittelfuß beider Füße und der rechten Hand operiert (Abbildung 3-3). Wegen einer Sprachentwicklungsverzögerung wurde eine logopädische Behandlung durchgeführt.

Nach dem Abschluss der Hauptschule besuchte er die Winzerfachschiule, die er mit dem Beruf des Winzermeisters abschloss. Sein abstraktes Denkvermögen ist als unauffällig einzustufen. Er hatte keine Probleme den Erläuterungen zum Bardet-Biedl-Syndrom und dem zugrunde liegenden Erbgang zu folgen.

Eine im Alter von 26 Jahren (1987) diagnostizierte Makuladegeneration, die dem Morbus Stargardt zugeordnet wurde, erwies sich als Retinitis pigmentosa. Diese Augenerkrankung ist im Anfangsstadium durch die Reduzierung des Sehfeldes, dem sogenannten Tunnelblick, charakterisiert und führt im weiteren Verlauf nahezu immer zur völligen Erblindung. Im gleichen Jahr wurde erstmals die Diagnose BBS gestellt. Zwei Jahre später begannen Schwierigkeiten mit dem Nachtsehen und seine Sehstärke ließ weiter nach. Diese Entwicklung war mit seinem Beruf als Winzermeister im Familienbetrieb nicht mehr vereinbar und er besuchte daher eine Umschulung zum Verwaltungsfachangestellten, dem Beruf, in dem er bis heute tätig ist. Sein jetziges Sehvermögen beträgt auf dem linken Auge 10% und auf dem rechten Auge 20%. Diese

Sehenschwäche kann er in seinem Beruf durch die Benutzung eines großen Monitors und besonders großer Schrift (Schriftgröße 18-20) gut ausgleichen.

Mit einer Körpergröße von 1,75 m und einem Gewicht von 98 kg hat der Patient einen Body Mass Index (BMI) von 32. Dieser Wert ist ein deutliches Zeichen von Adipositas. Zusätzlich wurden bei ihm das Fehlen des rechten Eckzahnes und eine leichte Brachydaktylie festgestellt (Abbildung 3-3). Eine nächtliche Polyurie wird medikamentös behandelt.

Nierenanomalien, Herzfehler, Diabetes mellitus, Leberfibrose und Hypogenitalismus sind ausgeschlossen worden.



Abbildung 3-3: Brachy- und Polydaktylie

l.o.: Brachydaktylie ist den Nebenkriterien des BBS zugeordnet. Die verkürzten Finger lassen sich auf diesem Bild gut erkennen.

r.o und l.u.: Eines der Hauptmerkmale des BBS ist die Polydaktylie. Der Patient 2192 wurde im Alter von einem Jahr an der rechten Hand, sowie beiden Füßen operiert. Die Narben sind als Zeichen der Operationen geblieben

3.3.3 Gegenüberstellung der Geschwister 2192 und 2185

Die zwei Jahre ältere Schwester 2185 ist ebenfalls am Bardet-Biedl-Syndrom erkrankt. Sie zeigt vier Hauptkriterien (Retinitis pigmentosa, Adipositas, Polydaktylie und Verhaltensauffälligkeiten) und ein Nebenkriterium (Sprachverzögerung).

Die gelernte Hauswirtschaftsmeisterin besuchte neun Jahre lang die Hauptschule. Bis vor kurzem war sie noch berufstätig. Ihre sehr schwere Sehbehinderung und die immer stärker werdenden Wesensveränderungen lassen die Ausübung ihres Berufes nicht mehr zu. Mit der Einstufung zur Schwerbehinderten (70%) hat sie ihre Rente beantragt.

Bei einer Körpergröße von 1,70 m und einem Gewicht von 72 kg liegt ihr errechneter Body Mass Index (BMI) bei 24,9.

Zusätzlich zu den Symptomen des BBS, die in der Tabelle 3-1 dargestellt sind, hat sie einen Pseudotumor cerebri, eine APC-Resistenz mit heterozygotem Faktor-V-Leiden und ein Uterusmyom.

Die Gegenüberstellung der Geschwister (Tabelle 3-2) zeigt, dass sie fast gleichartig betroffen sind und die Kriterien für das BBS nach Beales et al. 1999 erfüllen.

Tabelle 3-2: Gegenüberstellung der Geschwister 2192 und 2185

Klinisches Merkmal	2192 (Patient)	2185 (Schwester)
Hauptkriterien		
Retinitis pigmentosa	+	+
Polydaktylie	+	+
Adipositas	+	+
Lernschwierigkeiten / Verhaltensauffälligkeiten	-	+
Hypogonadismus beim Mann	-	
Nierenanomalien	-	-
Nebenkriterien		
Sprachverzögerung	+	+
Taubheit	-	-
Schielen / Linsentrübung / Astigmatismus	-	-
Brachydaktylie	+	-
Syndaktylie	-	-
Entwicklungsverzögerung	-	-
Koordinationsstörungen	-	-
Diabetes mellitus	-	-
Diabetes insipidus	-	-
Zahnstellungsanomalien	-	-
Hyper- / Hypodontismus	+	-
Herzfehler	-	-
Leberfunktionsstörungen	-	-

4 Ergebnisse

4.1 Molekulargenetische Analysen im *BBS1*-Gen

4.1.1 Genstruktur von *BBS1*

Das *BBS1*-Gen liegt auf Chromosom 11q13. Das Gen besteht aus 17 Exons, die eine Größe von 39 bp bis 1663 bp haben. Die Größe der 16 Introns variiert zwischen 0,1 kb und 3,7 kb (Mykytyn et al. 2002) (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: Exon- und Introngrößen von *BBS1* (Mykytyn et al. 2002)

Exon	Größe in bp	Intron	Größe in kb
Exon 01	59	Intron 01	0,3
Exon 02	77	Intron 02	0,1
Exon 03	35	Intron 03	3,2
Exon 04	273	Intron 04	0,9
Exon 05	47	Intron 05	0,1
Exon 06	39	Intron 06	0,1
Exon 07	73	Intron 07	3,7
Exon 08	132	Intron 08	1,5
Exon 09	107	Intron 09	2,1
Exon 10	121	Intron 10	0,1
Exon 11	159	Intron 11	2,2
Exon 12	70	Intron 12	0,5
Exon 13	159	Intron 13	3
Exon 14	134	Intron 14	0,9
Exon 15	135	Intron 15	0,6
Exon 16	87	Intron 16	0,2
Exon 17	1663		

Die häufigste Mutation ist eine Punktmutation in Exon 12. Es kommt an der Stelle 1779 zu einem Basenaustausch von Thymin (T) zu Guanin (G) (1779T → G). In Folge dieser Mutation kommt es zu einem Austausch von Methionin (M) zu Arginin (R) in dem von *BBS1* codierten Protein an Stelle 390 (Abbildung 4-1).

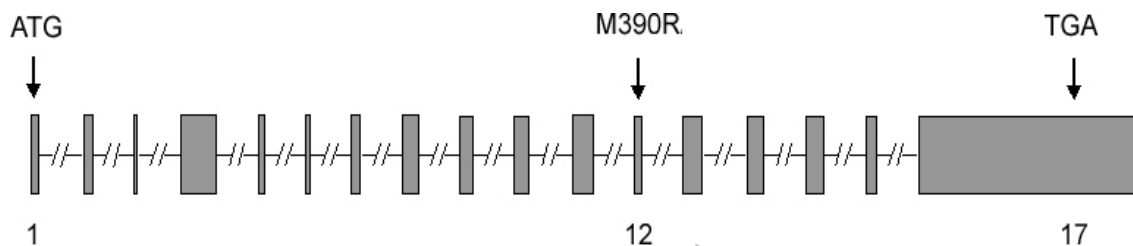


Abbildung 4-1: Genstruktur von *BBS1* (Mykytyn et al. 2002). Die Rechtecke stellen die 17 Exons dar. Das Startkodon ATG liegt in Exon 1, das Stoppkodon TGA in Exon 17. Die häufigste Mutation, der Basenaustausch von Thymin (T) zu Guanin (G), liegt in Exon 12. Diese Mutation bewirkt einen Aminosäureaustausch von Methionin (M) zu Arginin (R) in dem von *BBS1* codierten Protein an der Stelle 390.

4.1.2 Genotypisierung der Punktmutation 1779T → G in Exon 12

Der Basenaustausch von Thymin (T) zu Guanin (G) führt zum Austausch von Methionin (M) zu Arginin (R) in dem von *BBS1* codierten Protein. Homozygote Mutationen werden mit 390RR, heterozygote mit 390MR und der homozygote Wildtyp mit 390MM angegeben.

Zur Genotypisierung wurde das Exon 12 gemeinsam mit seinen flankierenden Bereichen mit Hilfe der PCR amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit der Länge 300 bp in eine Restriktionsspaltung eingesetzt. Die Punktmutation 1779G führt im PCR-Produkt mit den Primern Exon 12 89f und Exon 12 388r zu einer Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *AvaII* (Abbildung 4-2). Durch gelelektrophoretische Auftrennung der Verdauprodukte (104 bp und 196 bp) ist eine Genotypisierung möglich (Abbildung 4-3).

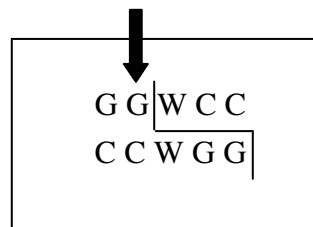


Abbildung 4-2: Darstellung der Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *AvaII*. Bei dem Basenaustausch von Thymin (T) zu Guanin (G) entsteht eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *AvaII*. Der schwarze Pfeil zeigt die Stelle des Basenaustausches (Position 1779) an. Abkürzungen: G = Guanin, C = Cytosin, W = Adenin oder Thymin.

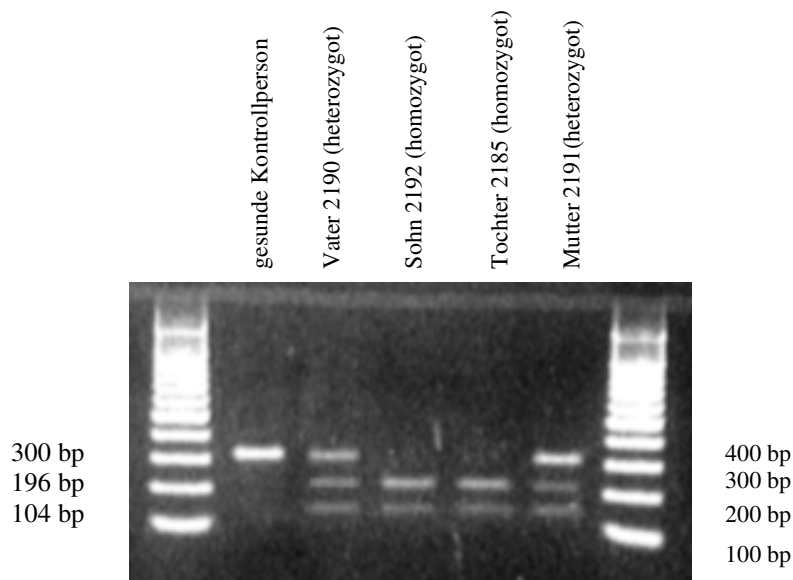



























Abbildung 4-3: Ergebnis der Restriktionsspaltung der DNA-Proben der Familie 2034 mit *AvaII* zur Mutationssuche in Exon 12. Gesunde zeigen nur das 300 bp lange Fragment. Heterozygote (Vater und Mutter) Träger der Mutation zeigen drei Fragmente mit den Längen 300 bp, 196 bp und 104 bp. Homozygote Träger der Mutation (Patient und seine betroffene Schwester) zeigen zwei Fragmente mit den Längen 196 bp und 104 bp.


4.1.2.1 Genotyp- und Allelfrequenzen bei Patienten mit BBS und Kontrollpersonen

Für die p.M390R-Mutation wurden 62 klinisch diagnostizierte BBS-Patienten und 50 Kontrollpersonen genotypisiert. Acht der 62 analysierten Patienten stammen aus der Türkei. Die übrigen 54 entstammen der kaukasischen Bevölkerungsgruppe.

Bei den analysierten Patienten sind 89% (55/62) Träger des homozygoten Wildtyps (390MM), 3% (2/62) sind heterozygote Träger der Mutation (390MR) und 8% (5/62) homozygote Träger (390RR). Alle acht türkischen Patienten zeigen den homozygoten Wildtyp. Die Allelfrequenz für das mutante Allel liegt demnach bei 10%.

Tabelle 4-2: Familienstruktur der sieben Indexpatienten mit den Genotypen 390MR und 390RR

Familiennummer	DNA-Nummer	Familienmitglied	BBS	Genotyp
2025	2081	Vater	-	
	2060	Sohn*	+	
	2083	Sohn	-	
	2084	Tochter	+	
	2082	Mutter	-	
2034	2190	Vater	-	
	2185	Sohn*	+	
	2192	Tochter	+	
	2191	Mutter	-	
2043	2142	Sohn	-	
	2143	Sohn	-	
	2144	Sohn*	+	
	2145	Mutter	-	
2048	2134	Vater	-	
	2136	Sohn	-	
	2135	Tochter*	+	
	2137	Mutter	-	
2053	2166	Vater	-	
	2169	Tochter*	+	
	2168	Tochter	+	
	2167	Mutter	-	
2054	2155	Vater	-	
	2160	Tochter*	+	
	2154	Mutter	-	
2057	2170	Patient*	+	

 = homozygoter Wildtyp (390MM),  = heterozygot (390MR),  = homozygot (390RR)

Familie 2034 ist die in der Kasuistik dieser Studie beschriebene Familie (Abschnitt 3.3)

* = Indexpatienten

4.2 Molekulargenetische Analysen im *BBS6*-Gen

4.2.1 Genstruktur von *BBS6*

Das *BBS6*-Gen liegt auf Chromosom 20p12. Das Gen besteht aus 6 Exons, die eine Größe von 111 bp bis 1402 bp haben. Die Größe der 5 Introns variiert zwischen 901 kb und 10925 kb (Slavotinek et al. 2000) (Tabelle 4-3).

Tabelle 4-3: Exon- und Introngrößen von *BBS6* (Slavotinek et al. 2000)

Exon	Größe in bp	Intron	Größe in kb
Exon 01	239	Intron 01	10,925
Exon 02	231	Intron 02	6,546
Exon 03	1402	Intron 03	3,726
Exon 04	176	Intron 04	0,901
Exon 05	111	Intron 05	1,928
Exon 06	504		

Exon 1 und Exon 2 sind nicht codierend. Das Startkodon ATG liegt in Exon 3. Exon 3 und Exon 6 mussten aufgrund ihrer für die SSC-Analyse ungünstigen Größe in mehrere Abschnitte unterteilt werden (Abbildung 4-4, Tabelle 2-2). Für Exon 4 und Exon 5 war dieser Schritt nicht notwendig.

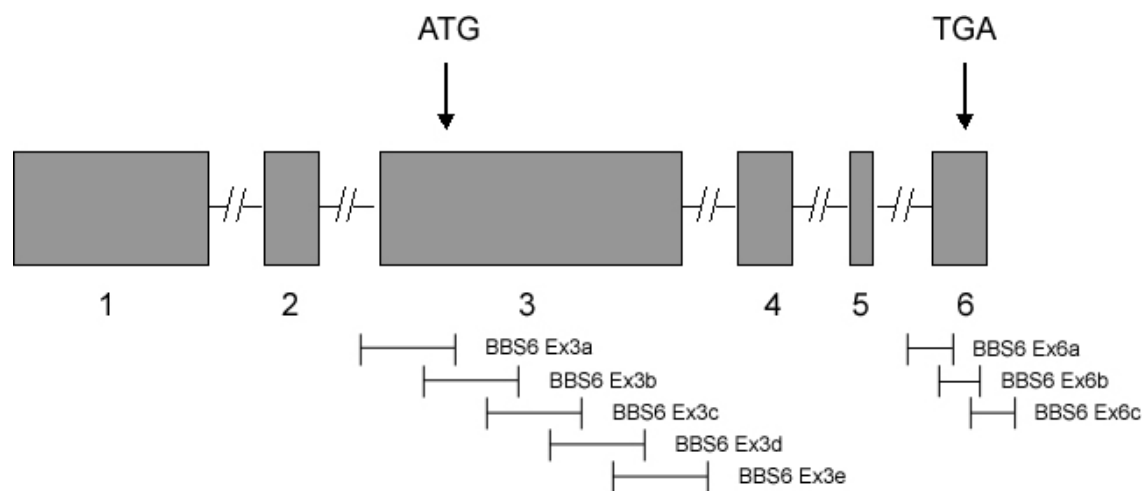


Abbildung 4-4: Genstruktur von *BBS6* (Slavotinek et al. 2000). Die Rechtecke stellen die sechs Exons dar. Exon 1 und Exon 2 sind nicht codierend. Das Startkodon ATG liegt in Exon 3, das Stoppkodon TGA in Exon 6. Zusätzlich eingezeichnet sind die sich überlappenden PCR-Produkte mit deren Primerbezeichnungen für Exon 3 und Exon 6.

4.2.2 SSC-Analyse in *BBS6*

Exon 3 und Exon 6 mussten aufgrund ihrer Größen, die ungeeignet für die SSC-Analyse sind, in kleinere Abschnitte unterteilt werden (Tabelle 2-2). Exon 1 und Exon 2 sind nicht codierend und wurden daher auch nicht in das Mutationsscreening einbezogen. Es wurden 62 Patienten sowie acht betroffene Geschwister analysiert. Ausgewertet wurde das Laufverhalten der DNA-Fragmente im Gel, aberrante Einzelstränge sowie Doppelstränge. Die DNA-Proben der Patienten, die als auffällig eingestuft wurden, sind anschließend zusammen mit DNA-Proben der Familienangehörigen, sofern wir von diesen DNA-Proben hatten, erneut analysiert worden. Alle Analysen wurden bei einer Pufferkammertemperatur von 10°C und 20°C durchgeführt.

4.2.2.1 Exon 3

4.2.2.1.1 Primerkombination Ex3a 89F / 328R

Bei der SSC-Analyse zeigten die DNA-Proben der Patienten 2125 (Abbildung 4-5), 2031 und 2185 (Abbildung 4-6) im Vergleich zu den DNA-Proben anderer Patienten ein verändertes Laufverhalten im Gel (n=3/62). Das Laufverhalten dieser drei auffälligen Proben ähnelte sich zwar, war allerdings nicht identisch.

Daraufhin wurde die DNA der Patienten 2125, 2185 und 2031 zusammen mit den Proben ihrer Familienmitglieder erneut analysiert (Abbildung 4-7). Nur die DNA des Patienten 2125 zeigte wiederholt ein auffälliges Laufverhalten (1/62). Die DNA-Proben seiner Eltern 2122 (Vater) und 2123 (Mutter) zeigten ebenfalls Auffälligkeiten.

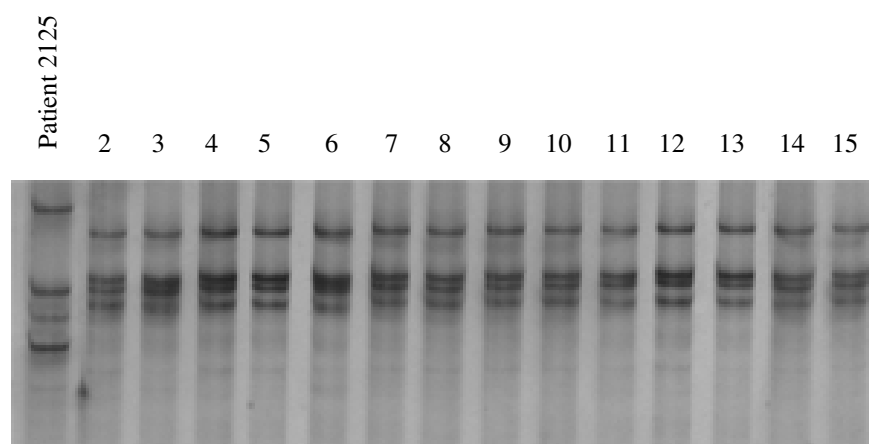


Abbildung 4-5: 12% PAA-Gel, Temperatur 10°C, *BBS6*, Exon 3 (Primer *BBS6* Ex3a 89F und *BBS6* Ex3a 328R). Die DNA des Patienten 2125 zeigte im Vergleich zu den anderen Patienten (Spur 2-15) ein verändertes Laufverhalten.

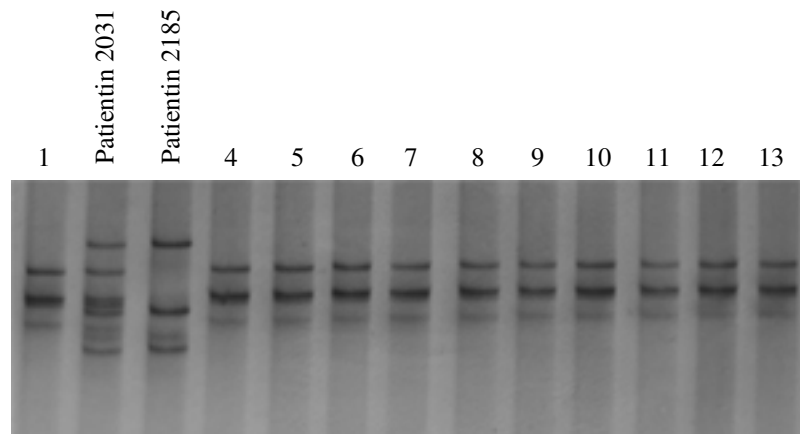


Abbildung 4-6: 12% PAA-Gel, Temperatur 10°C, *BBS6*, Exon 3 (Primer *BBS6 Ex3a 89F* und *BBS6 Ex3a 328R*). Die DNA der Patientinnen 2031 und 2185 zeigte ein auffälliges Laufverhalten. Die übrigen elf DNA-Proben von BBS-Patienten (Spur 1, 4-13) dagegen nicht.

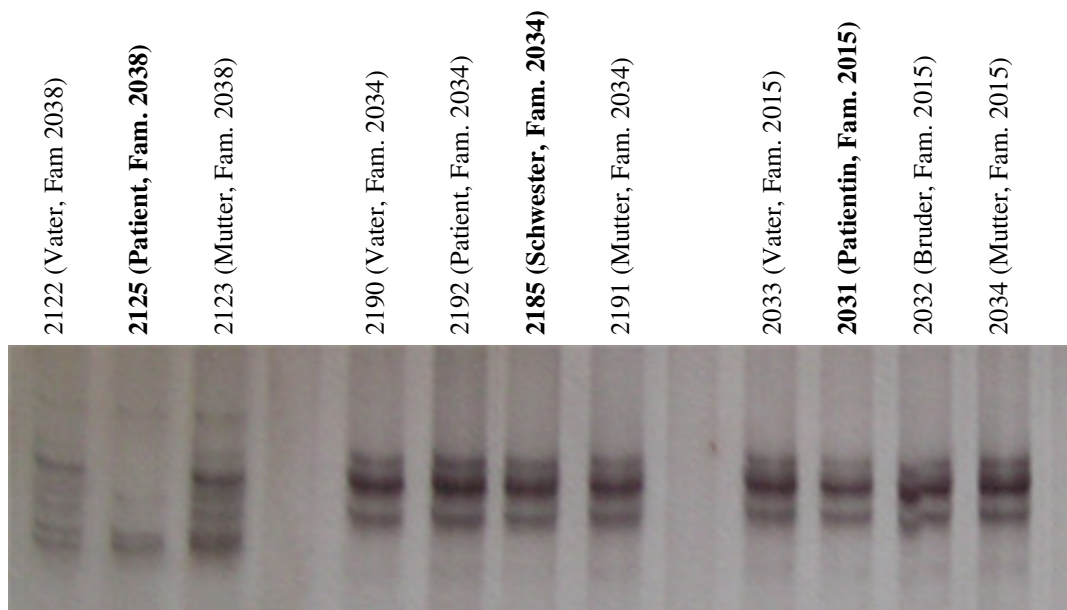


Abbildung 4-7: 12% PAA-Gel, Temperatur 10°C, *BBS6*, Exon 3 (Primer *BBS6 Ex3a 89F* und *BBS6 Ex3a 328R*). Die DNA der Patientinnen 2185 und 2031 bestätigten ihre Auffälligkeit nicht. Die DNA des Patienten 2125 dagegen ist erneut auffällig gewesen. Auch die DNA-Proben seiner Eltern 2122 und 2123 zeigten ein anderes Laufverhalten im Gel im Vergleich zu den anderen DNA-Proben auf dem Gel.

4.2.2.1.2 Primerkombination Ex3b 23F / 386R

Sieben DNA-Proben von BBS-Patienten (n=7/62) zeigten in einer ersten Untersuchung Auffälligkeiten. Eine zusätzliche Bande zeigten die DNA-Proben der Patienten 2087 und 2125 (Abbildung 4-8A, roter Pfeil). Die DNA-Proben der Patienten 2017, 2020, 2024 und 2065 zeigten ebenfalls ein auffälliges Laufverhalten (Abbildung 4-8B). Auch die DNA des Patienten 2168 (Abbildung 4-8C) zeigte eine Auffälligkeit.

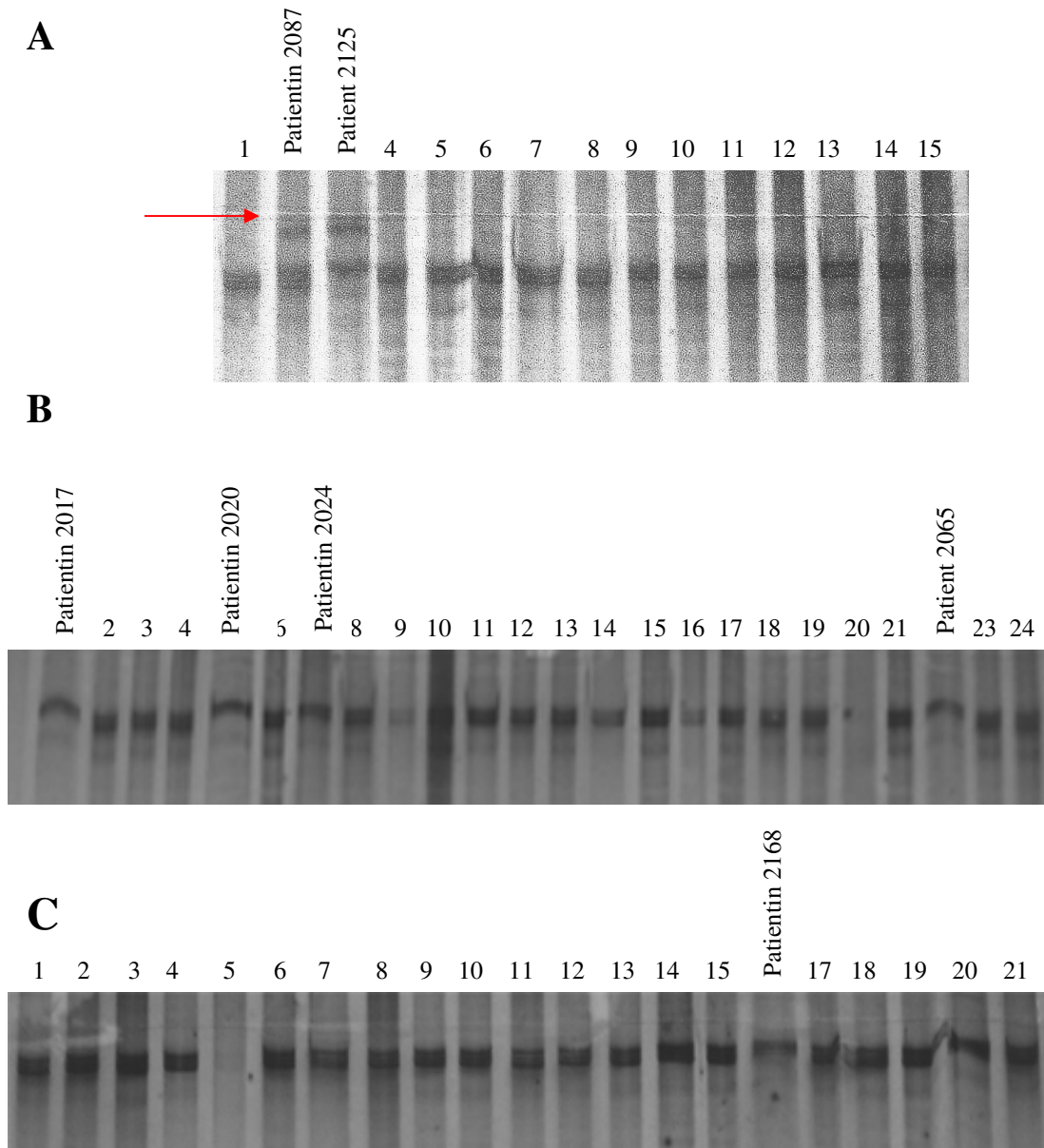


Abbildung 4-8: 12% PAA-Gele, Temperatur 20°C, *BBS6*, Exon 3 (Primer *BBS6* Ex3b 23F und *BBS6* Ex3b 386R). Dargestellt sind die Bandenmuster von 61 BBS-Patienten. Der rote Pfeil zeigt auf die Höhe der zusätzlichen Banden bei den DNA-Proben der Patienten 2087 und 2125.

Die auffälligen DNA-Proben der Patienten 2087, 2125, 2017, 2020, 2024, 2065 und 2168 wurden daraufhin zusammen mit ihren Familienmitgliedern erneut analysiert. Nur die DNA-Proben der Patienten 2125 und 2087 bestätigten ihre Auffälligkeit (n=2/62). Auch die DNA-Proben der Familienmitglieder dieser Patienten, bis auf die DNA der Mutter von 2087, zeigten ebenfalls zusätzliche Banden (Abbildung 4-9, roter Pfeil).

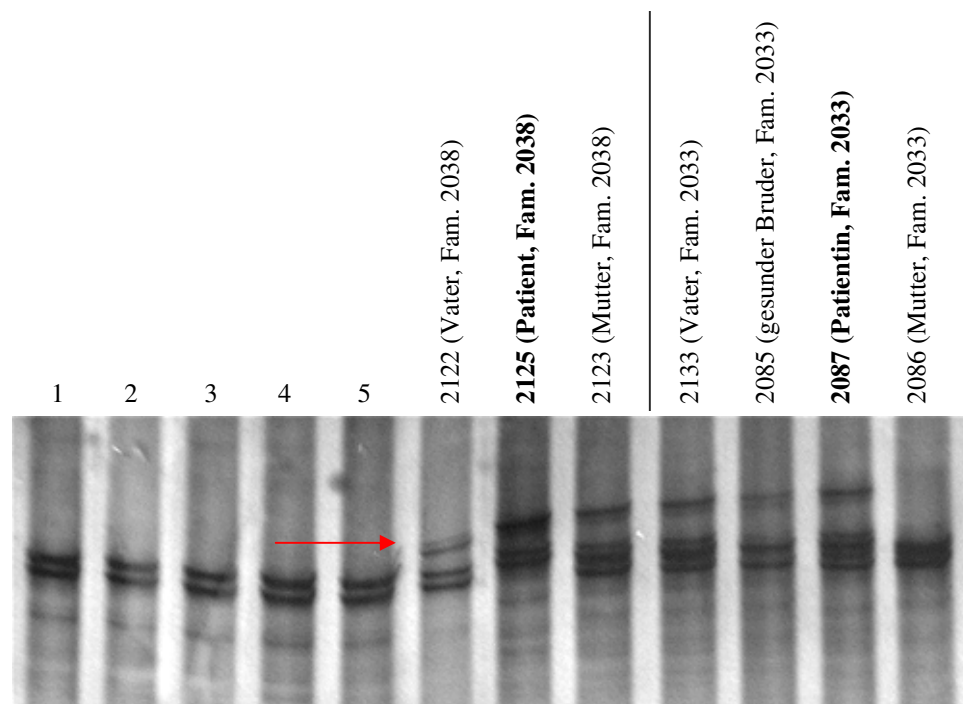


Abbildung 4-9: 12% PAA-Gel, Temperatur 10°C, *BBS6*, Exon 3 (Primer *BBS6 Ex3b 23F* und *BBS6 3b 386R*). Der rote Pfeil zeigt auf die zusätzliche Bande im Einzelstrang. Der Doppelstrang der DNA-Proben (hier nicht zu sehen) blieb unauffällig.

4.2.2.1.3 Primerkombination Ex3c 124F / 419R

Bei einer ersten Analyse der DNA-Proben der 62 BBS-Patienten zeigten die Proben von 12 Patienten (n=12/62) eine zusätzliche Bande im Einzelstrang auf dem Gel (Abbildung 4-10, roter Pfeil). Daraufhin wurde nur die DNA des Patienten 2078 zusammen mit DNA-Proben seiner Familie wiederholt aufgetragen. Die zusätzliche Bande bestätigte sich bei der DNA-Probe des Patienten 2078. Alle DNA-Proben seiner Familienmitglieder zeigten ebenfalls diese zusätzliche Bande. Auch der Doppelstrang zeigte sich mit einer zusätzlichen Bande (Abbildung 4-10, blauer Pfeil).

Die hohe Anzahl der DNA-Proben von BBS-Patienten (n=12/62) mit den zusätzlichen Banden im Einzel- und Doppelstrang lassen eine mit BBS assoziierte Sequenzvariante fragwürdig erscheinen und eher an einen Polymorphismus denken.

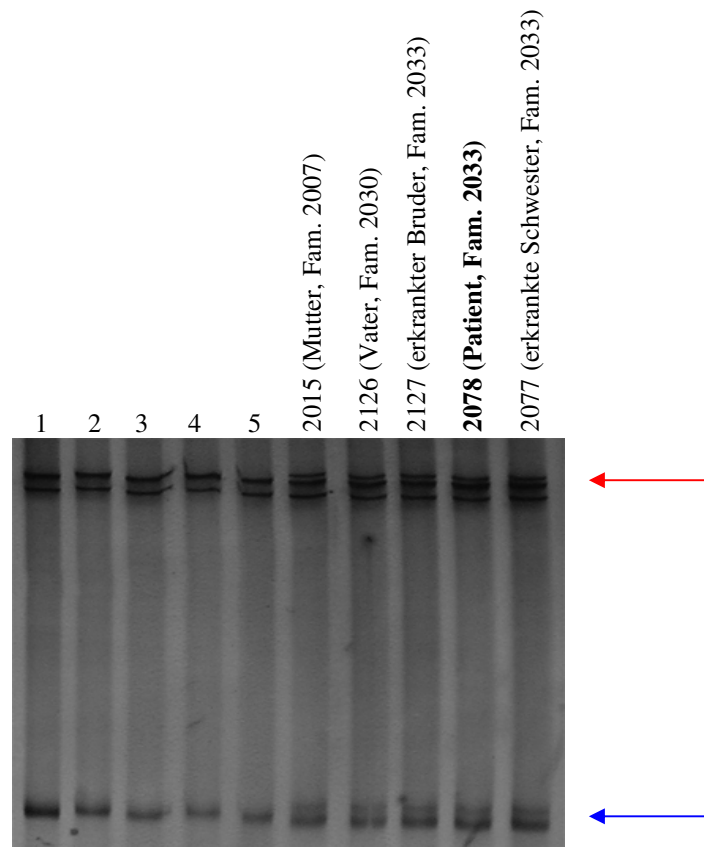


Abbildung 4-10: 12% PAA-Gel, Temperatur 20°C, *BBS6*, Exon 3 (Primer *BBS6 Ex3c 124F* und *BBS6 Ex3c 419R*). Die DNA der Familienmitglieder des Patienten 2078 zeigten alle die gleiche zusätzliche Bande im Einzelstrang (roter Pfeil) und im Doppelstrang (blauer Pfeil). Auch die DNA-Probe der Mutter 2015 der Familie 2007 zeigte die zusätzlichen Banden im Einzel- und Doppelstrang.

4.2.2.1.4 Primerkombination Ex3d 62F / 400R

Abbildung 4-11 zeigt ein Beispiel für das Laufverhalten der DNA-Proben in einem 12% PAA-Gel. Von den 62 analysierten Proben sind die DNA-Proben von 13 BBS-Patienten dargestellt. Keine Probe zeigte Auffälligkeiten (n=0/62).

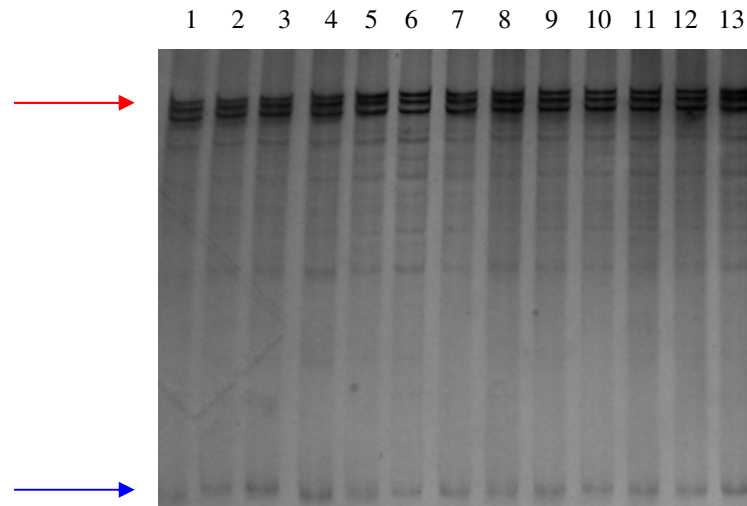


Abbildung 4-11: 12% PAA-Gel, Temperatur 10°C, *BBS6*, Exon 3 (Primer *BBS6* Ex3d 62F und *BBS6* Ex3d 400R). Die Einzelstrangkongformationen sind mit dem roten Pfeil, die Doppelstrangkongformationen mit dem blauen Pfeil gekennzeichnet.

4.2.2.1.5 Primerkombination Ex3e 83F / 369R

Abbildung 4-12 zeigt ein Beispiel für das Laufverhalten der DNA-Proben in einem 12% PAA-Gel. Von den 62 analysierten Proben sind die DNA-Proben von 12 BBS-Patienten dargestellt. Keine Probe zeigte Auffälligkeiten (n=0/62).

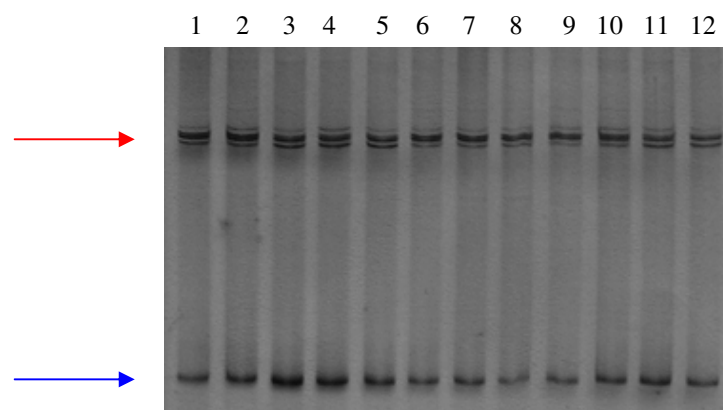


Abbildung 4-12: 12% PAA-Gel, Temperatur 20°C, *BBS6*, Exon 3 (Primer *BBS6* Ex3e 83F und *BBS6* Ex3e 369R). Die Einzelstrangkongformationen sind mit dem roten Pfeil, die Doppelstrangkongformationen mit dem blauen Pfeil gekennzeichnet.

4.2.2.2 Exon 4

4.2.2.2.1 Primerkombination Ex4 146F / 431R

Abbildung 4-13 zeigt ein Beispiel für das Laufverhalten der DNA-Proben in einem 12% PAA-Gel. Von den 62 analysierten Proben sind die DNA-Proben von fünf BBS-Patienten dargestellt. Keine Probe zeigte Auffälligkeiten (n=0/62).

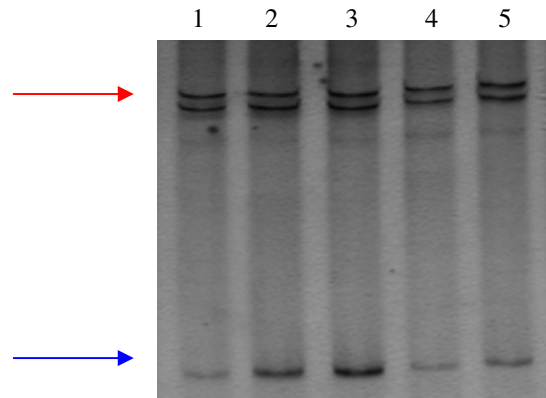


Abbildung 4-13: 12% PAA-Gel, Temperatur 20°C, *BBS6*, Exon 4 (Primer *BBS6 Ex4 146F* und *BBS6 Ex 431R*). Die Einzelstrangkonnformationen sind mit dem roten Pfeil, die Doppelstrangkonnformationen mit dem blauen Pfeil gekennzeichnet.

4.2.2.3 Exon 5

4.2.2.3.1 Primerkombination Ex5F / Ex5R

Abbildung 4-14 zeigt ein Beispiel für das Laufverhalten der DNA-Proben in einem 12% PAA-Gel. Von den 62 analysierten Proben sind die DNA-Proben von 8 BBS-Patienten dargestellt. Keine Probe zeigte Auffälligkeiten (n=0/62).

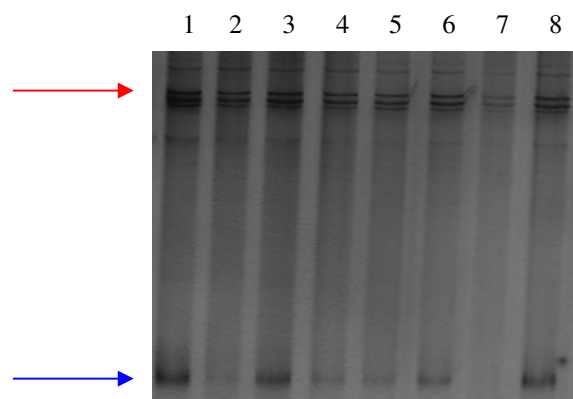


Abbildung 4-14: 12% PAA-Gel, Temperatur 20°C, *BBS6*, Exon 5 (Primer *BBS6 Ex5F* und *BBS6 Ex5R*). Die Einzelstrangkonnformationen sind mit dem roten Pfeil, die Doppelstrangkonnformationen mit dem blauen Pfeil gekennzeichnet.

4.2.2.4 Exon 6

4.2.2.4.1 Primerkombination Ex6a 72F / 404R

Abbildung 4-15 zeigt ein Beispiel für das Laufverhalten der DNA-Proben in einem 12% PAA-Gel. Von den 62 analysierten Proben sind die DNA-Proben von 16 BBS-Patienten dargestellt. Keine Probe zeigte Auffälligkeiten (n=0/62).

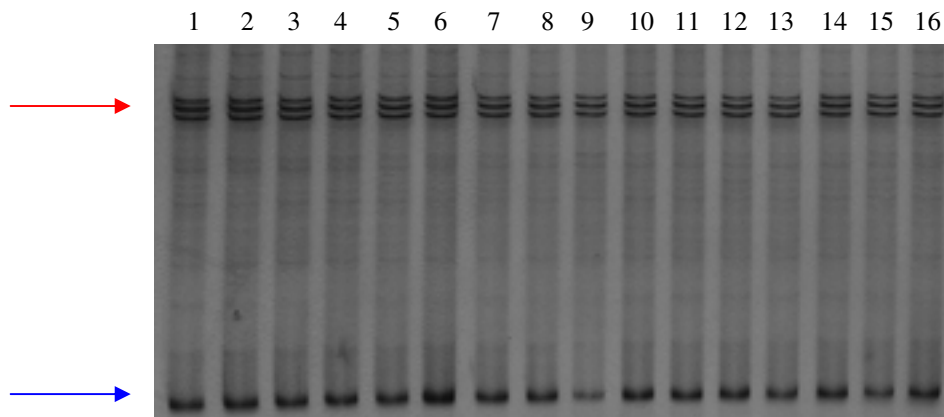


Abbildung 4-15: 12% PAA-Gel, Temperatur 20°C, *BBS6*, Exon 6 (Primer *BBS6 Ex6a 72F* und *BBS6 Ex6a 404R*). Die Einzelstrangkongformationen sind mit dem roten Pfeil, die Doppelstrangkongformationen mit dem blauen Pfeil gekennzeichnet.

4.2.2.4.2 Primerkombination Ex6b 103F / 395R

Bei der SSC-Analyse mit diesen Primern konnten drei verschiedene Konformationen entdeckt werden. Abbildung 4-16 zeigt ein Beispiel für das Laufverhalten der DNA-Proben in einem 12% PAA-Gel. Von den 62 analysierten Proben sind die DNA-Proben von 21 Patienten dargestellt.

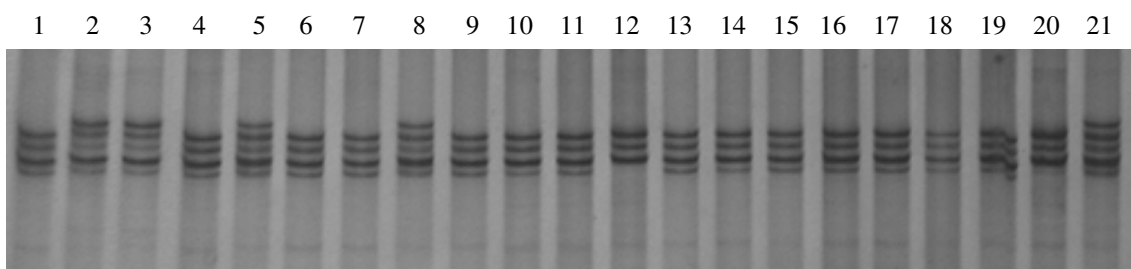


Abbildung 4-16: 12% PAA-Gel, Temperatur 20°C, *BBS6*, Exon 6 (Primer *BBS6 Ex6b 103F* und *BBS6 Ex6b 395R*). Es konnten drei verschiedene Konformationen entdeckt werden. Konformation 1 = Spur 1, Konformation 2 = Spur 2 und Konformation 3 = Spur 12.

50 Patienten zeigten die Konformation mit vier Banden (n=50/62) (Abbildung 4-16, Spur 1), fünf Banden zeigten acht Patienten (n=8/62) (Abbildung 4-16, Spuren 2, 3, 5, 8, 21) und drei Banden zeigten vier Patienten (n=4/62) (Abbildung 4-16, Spur 12). Die Häufigkeiten, mit der diese drei Formen auftreten, führen zur Annahme, dass es sich

hierbei am wahrscheinlichsten um einen Polymorphismus handelt und nicht um eine mit BBS assoziierte Sequenzvariante.

4.2.2.4.3 Primerkombination Ex6c 63F / 348R

Bei der SSC-Analyse mit diesen Primern wurden bei den DNA-Proben der Patienten 2087 und 2125 (n=2/62) wiederholt Auffälligkeiten entdeckt (Abbildung 4-17).

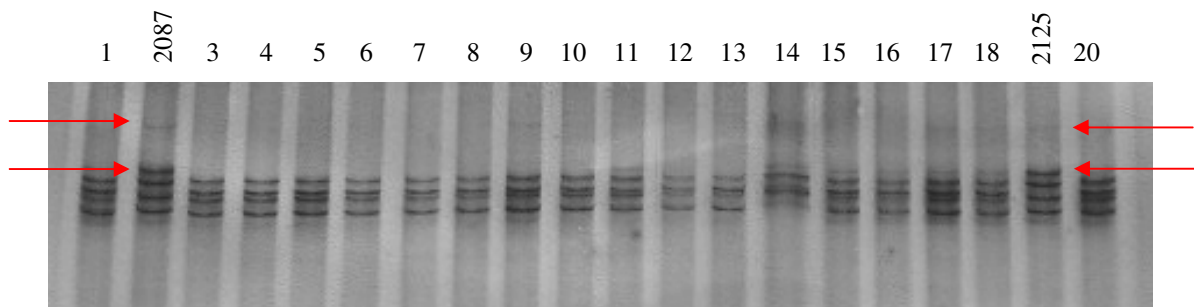


Abbildung 4-17: 12% PAA-Gel, Temperatur 10°C, *BBS6*, Exon 6 (Primer *BBS6* Ex6c 63F und *BBS6* Ex6c 348R). Die DNA des Patienten 2087 (Spur 2) und des Patienten 2125 (Spur 19) zeigten im Vergleich zu den anderen Proben auf diesem Gel zwei zusätzliche Banden (rote Pfeile).

4.2.3 Zusammenfassung der SSCA-Ergebnisse von *BBS6*

Es wurden 62 DNA-Proben von BBS-Patienten auf Sequenzvarianten in *BBS6* analysiert. Auffällige Patienten wurden mit ihren Familienmitgliedern, sofern deren DNA vorhanden war, erneut analysiert. In Exon 3 sind die DNA-Proben von 12 (n=12/62) Patienten mit wiederholten Auffälligkeiten entdeckt worden. Exon 4 und Exon 5 blieben unauffällig. Bei den Analysen in Exon 6 zeigten die DNA-Proben von zwei Patienten Auffälligkeiten (n=2/62). Zusätzlich konnten in Exon 6 verschiedene Konformationen der DNA-Proben gehäuft nachgewiesen werden, was für das Vorhandensein eines Polymorphismus spricht. Für die weitere Analyse wurde bei den DNA-Proben der auffälligen Patienten eine Sequenzanalyse durchgeführt.

Tabelle 4-4: Zusammenfassung der SSCA-Ergebnisse von *BBS6*

Exon	Verdacht auf pathologische Sequenzvarianten bei den Probanden mit den DNA-Nummern	Anzahl auffälliger BBS-Patienten	Anhalt für einen Polymorphismus in diesem Exon
3	2125, 2087, 2077, 2019, 2023, 2059, 2065, 2089, 2104, 2160, 2183, 2189	(n=12/62)	Nein
4	keine Auffälligkeiten		Nein
5	keine Auffälligkeiten		Nein
6	2087, 2125	(n=2/62)	Ja

4.2.4 Sequenzanalysen im *BBS6*-Gen

Es wurden die DNA-Proben von 20 Patienten und 11 Familienmitgliedern (vier Väter, drei Mütter, drei erkrankte Geschwister und ein gesunder Bruder) sequenziert. Dabei konnten vier verschiedene Mutationen gefunden werden. Alle vier Mutationen sind bereits in der Literatur beschrieben worden. Es handelt sich ausschließlich um Punktmutationen, die einen Basenaustausch zur Folge haben.

Die Mutation p.I178I ist eine stille Mutation, die keinen Austausch einer Aminosäure im Protein verursacht.

Die Mutationen p.Y37C, p.R517C und p.G532V bewirken einen Aminosäureaustausch in dem von *BBS6* codierten Protein, wobei die Mutation p.R517C mit einer Allelfrequenz von 11% in der Normalbevölkerung bereits als Polymorphismus beschrieben worden ist (Andersen et al 2004).

Tabelle 4-5 gibt eine Übersicht der gefundenen Mutationen in *BBS6*. Angegeben ist die Anzahl heterozygoter und homozygoter Träger der jeweiligen Mutation, sowie die daraus resultierende Allelfrequenz im analysierten Patientenkollektiv (n=62). Die Patienten 2087 und 2125 sind Träger der Mutationen p.Y37C, p.G532V und der stillen Mutation p.I178I.

Grundlage aller Auswertungen war die Referenzsequenz AF221993.1.

Tabelle 4-5: Übersicht der gefundenen Mutationen in *BBS6* bei 20 BBS-Patienten

Mutation	Exon	homozygot	heterozygot	Allelfrequenz	Lit.
p.Y37C	3	1	1	2,4%	1
p.I178I (stille Mutation)	3	0	12	9,6%	2
p.R517C	6	0	8	6,5%	2
p.G532V	6	2	0	3,2%	2

p = Nomenklatur bezieht sich auf das Protein,

Lit. = Literaturstellen in denen die jeweilige Mutation bereits beschrieben worden ist:








1) Katsanis et al. 2004




2) Andersen et al. 2004

4.2.4.1 Punktmutation p.Y37C

Zwei der 62 Patienten (2/62) sind Träger der p.Y37C-Mutation (Tabelle 4-6). Der Basenaustausch von Adenin (A) zu Guanin (G) an der Stelle 110 in Exon 3 führt zu einem Austausch der Aminosäure Tyrosin (Y) zu Cystein (C) an Stelle 37 des von *BBS6* codierten Proteins.

Tabelle 4-6: Familienstruktur der Indexpatienten 2087 und 2125 für die Mutation p.Y37C

Familiennummer	DNA-Nummer	Familienmitglied	BBS	Genotyp
2033	2133	Vater	-	
	2085	Bruder	-	
	2087	Patient	+	
	2086	Mutter	-	
2038	2122	Vater	-	
	2125	Patient	+	
	2123	Mutter	-	

 = homozygoter Wildtyp (37YY),  = heterozygot (37YC),  = homozygot (37CC)

Exemplarisch sind Ausschnitte der Sequenzanalyse der Familienmitglieder der Familie 2038 in Abbildung 4-18 dargestellt. Der Patient 2125 ist homozygoter Träger der p.Y37C-Mutation und seine Eltern sind heterozygote Träger dieser Mutation. Die gesunde Kontrollperson zeigt den homozygoten Wildtyp.

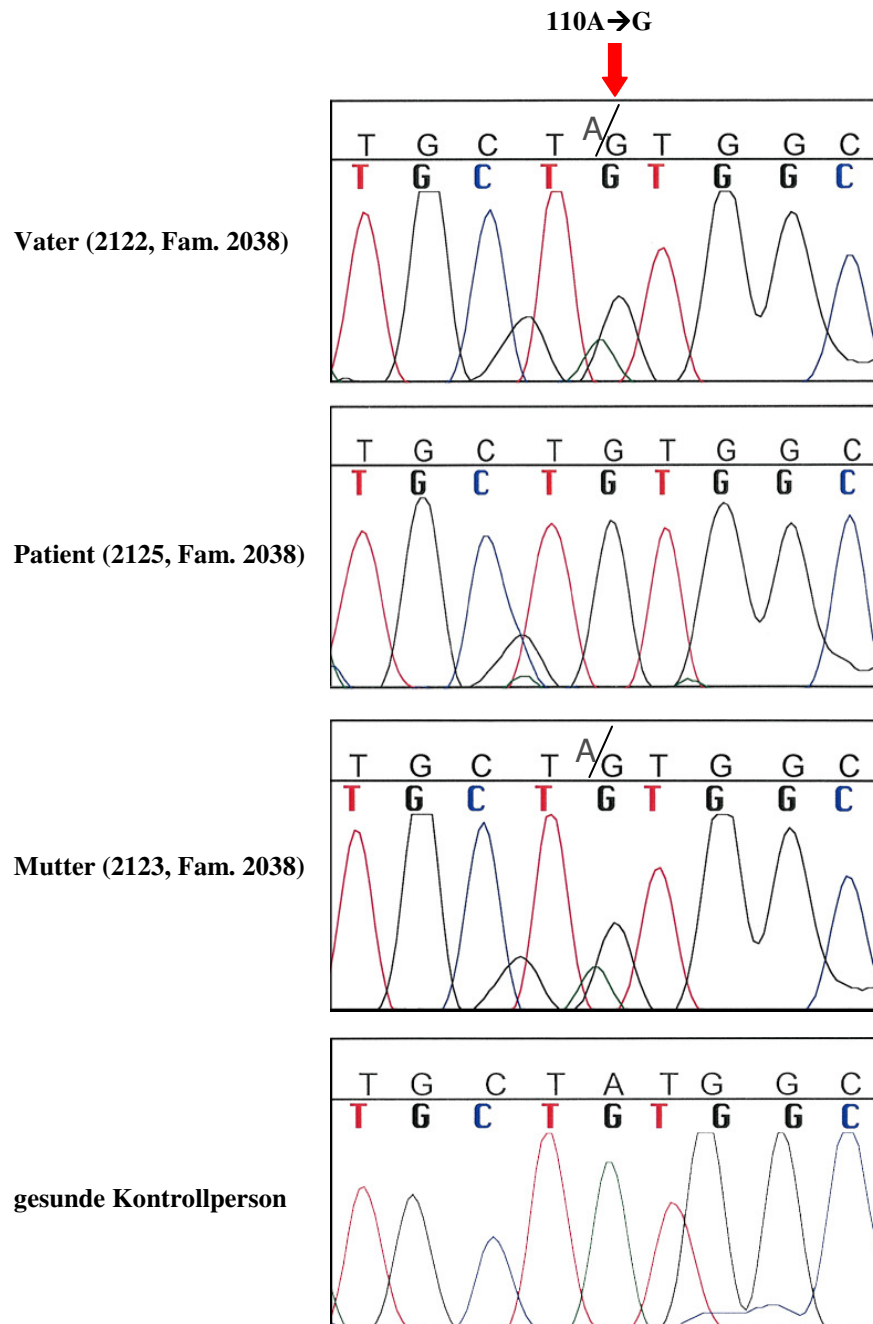


















Abbildung 4-18: Ausschnitte der Sequenzanalyse des Exons 3a bei den Familienmitgliedern der Familie 2038 und einer gesunden Kontrolle. Der Vater 2122 und die Mutter 2123 sind heterozygote Träger des Basenaustausches 110A→G (p.Y37C- Mutation). Im Vergleich zu der gesunden Kontrollperson trägt der Patient 2125 die Mutation in homozygoter Form.

4.2.4.2 Punktmutation p.I178I

12 der 62 Patienten (n=12/62) sind heterozygote Träger der p.I178I-Mutation (Tabelle 4-7). Die Base an der Stelle 534 in Exon 3 ist eine Wobble Base (dritte Base im codierenden Triplet). Der Austausch von Cytosin (C) zu Thymin (T) an dieser Position führt nicht zu einer Veränderung des BBS6-Proteins. Die Aminosäure Isoleucin (I) bleibt trotz Mutation erhalten. Exemplarisch ist die Sequenz des Patienten 2078 mit einer gesunden Kontrolle in Abbildung 4-19 dargestellt.

Tabelle 4-7: 12 Indexpatienten mit nachgewiesener p.I178I-Mutation

Familiennummer	DNA-Nummer	Familienmitglied	BBS	Genotyp
2030	2126	Vater	-	
	2078	Bruder	+	
	2077	Schwester	+	
	2127	Patient	+	
2008				
	2019	Patient	+	
2010				
	2023	Patient	+	
2024				
	2059	Patient	+	
2028				
	2065	Patient	+	
2033				
	2087	Patient	+	
2038				
	2125	Patient	+	
2040				
	2089	Patient	+	
2045				
	2104	Patient	+	
2054				
	2160	Patient	+	
2059				
	2183	Patient	+	
2061				
	2189	Patient	+	

 = heterozygoter Träger der p.I178I-Mutation (178II)

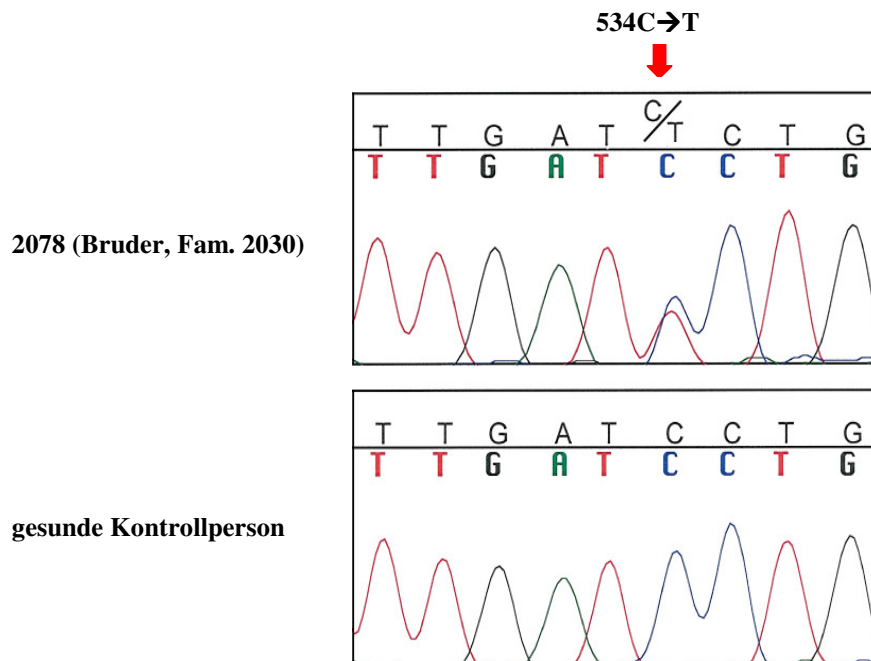


Abbildung 4-19: Ausschnitte der Sequenzanalyse des Exons 3c des Probanden 2078 und einer gesunden Kontrolle. Der Proband 2078 ist im Vergleich zu der gesunden Kontrolle heterozygoter Träger des Basenaustausches 534C→T (Mutation p.I178I).

4.2.4.3 Punktmutation p.R517C

Der Basenaustausch von Cytosin (C) zu Thymin (T) an der Stelle 1549 in Exon 6 führt zu einem Austausch der Aminosäure Arginin (R) zu Cystein (C) an Stelle 517 des von *BBS6* codierten Proteins. Diese Mutation wurde bereits in der Literatur als Polymorphismus beschrieben (Andersen et al 2004).

Die SSC-Analyse zeigte drei verschiedene Laufverhalten der Proben im Gel. Die DNA-Proben von vier Patienten (n=4/62) zeigten drei Banden (wie die Probe des Patienten 2197), 50 Proben (n=50/62) zeigten vier Banden (wie die Probe des Patienten 2198) und acht Proben (n=7/62) zeigten fünf Banden (wie die Probe des Patienten 2127).

Die DNA-Proben der Patienten 2127, 2197 und 2198 wurden sequenziert. Die DNA-Proben der Patienten 2197 und 2198 zeigten den homozygoten Wildtyp (Tabelle 4-8). Die DNA-Probe des Patienten 2127 zeigte die Mutation p.R517C in heterozygoter Form (Abbildung 4-20). Die weiteren DNA-Proben der BBS-Patienten, die auf der SSC-Analyse das identische Laufverhalten, wie die DNA des Patienten 2127 zeigten wurden mit dem Restriktionsenzym *NspI* genotypisiert (s.u.). Homozygote Träger der p.R517C-Mutation konnten nicht gezeigt werden.

Tabelle 4-8: Analysen im Exon 6 des *BBS6*-Gens

DNA-Nummer	Ergebnis der SSCA	Ergebnis der Sequenzanalyse
2197	3 Banden	Träger des homozygoten Wildtyps
2198	4 Banden	Träger des homozygoten Wildtyps
2127	5 Banden	Träger der heterozygoten p.R517C-Mutation

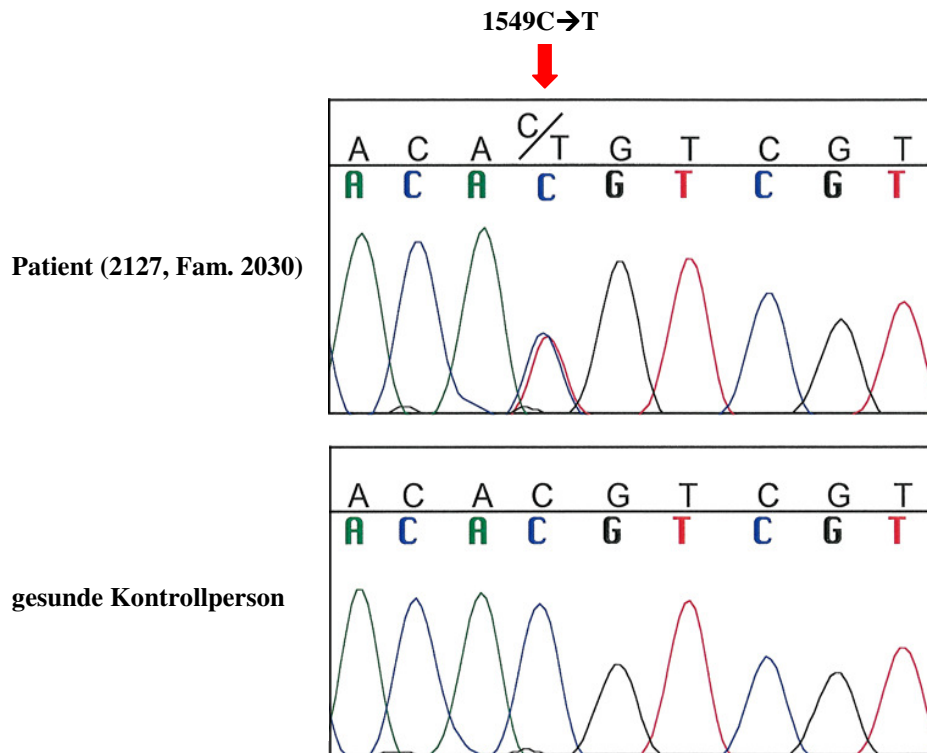


Abbildung 4-20: Ausschnitte der Sequenzanalyse des Exons 6b des Patienten 2127 und einer gesunden Kontrolle. Der Patient 2127 ist heterozygoter Träger des Basenaustausches 1549C→T (Mutation p.R517C). Die gesunde Kontrolle zeigt den homozygoten Wildtyp.

4.2.4.3.1 Genotypisierung der Punktmutation p.R517C in Exon 6 mit der Restriktionsendonuklease *NspI*

Der Basenaustausch von Cytosin (C) zu Thymin (T) an der Stelle 1549 führt zu einem Austausch der Aminosäure Arginin (R) zu Cystein (C) an der Stelle 517 des von *BBS6* codierten Proteins. Zur Genotypisierung wurde das Exon 6 gemeinsam mit seinen flankierenden Bereichen mit Hilfe der PCR amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit der Länge 293 bp in eine Restriktionsspaltung eingesetzt. Die Punktmutation 1549G führt im PCR-Produkt mit den Primern Ex6b 103F und Ex6b 395R zu einer Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *NspI* (Abbildung 4-21). Durch gelelektrophoretische Auftrennung der Verdauprodukte (176 bp und 117 bp) ist eine Genotypisierung möglich (Abbildung 4-22). Acht der 62 Patienten (n=8/62) zeigten Auffälligkeiten bei der SSC-Analyse des Exons 6b. Der Patient 2127 wurde sequenziert und erwies sich als heterozygoter Träger der p.R517C-Mutation. Von den sieben übrigen Patienten sind sechs Patienten (n=6/7) heterozygote Träger der p.R517C-Mutation (s.o.). Einzig die Patientin 2055 zeigte nicht das erwartete Ergebnis. Obwohl ihre DNA-Probe bei der SSC-Analyse das gleiche Laufverhalten, wie die DNA-Proben der anderen sieben auffälligen DNA-Proben zeigte, wurde das PCR-Produkt ihrer DNA nicht durch die Restriktionsendonuklease *NspI* gespalten. Homozygote Träger der

Mutation sind in der Literatur bisher nicht beschrieben worden und konnten auch in dieser Studie nicht gezeigt werden.

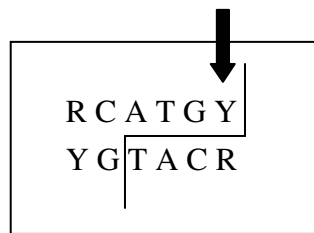


Abbildung 4-21: Darstellung der Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *NspI*. Bei dem Basenaustausch von Cytosin (C) zu Thymin (T) entsteht eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *NspI*. Der schwarze Pfeil zeigt die Stelle des Basenaustausches (Position 1549) an. Abkürzungen: G = Guanin, C = Cytosin, A = Adenin, T = Thymin, R = Adenin oder Guanin, Y = Cytosin oder Thymin.

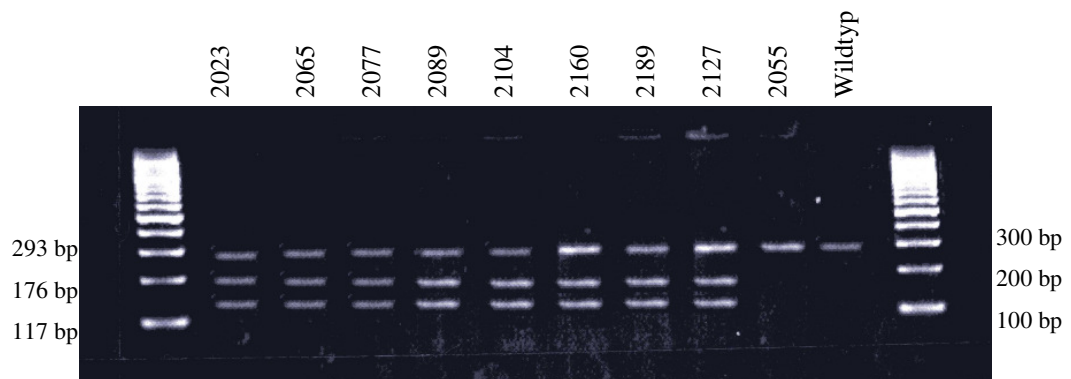


Abbildung 4-22: Restriktionsspaltung mit *NspI* zur Mutationssuche in Exon 6 Träger des homozygoten Wildtyps zeigen nur ein Fragment der Länge 293 bp. Heterozygote Träger der p.R517C-Mutation zeigen drei Fragmente mit den Längen 293 bp, 176 bp und 117 bp.

Tabelle 4-9: Der Polymorphismus p.R517C im analysierten Patientenkollektiv





Familiennummer	DNA-Nummer	Familienmitglied	BBS	Genotyp	Bestimmung
2030	2127	Patient	+	■	Sequenz
	2077	Bruder	+	■	<i>NspI</i>
2061	2189	Patient	+	■	<i>NspI</i>
2010	2023	Patient	+	■	<i>NspI</i>
2028	2065	Patient	+	■	<i>NspI</i>
2040	2089	Patient	+	■	<i>NspI</i>
2045	2104	Patient	+	■	<i>NspI</i>
2054	2160	Patient	+	■	<i>NspI</i>



■ = heterozygoter Träger (517RC)

4.2.4.4 Punktmutation p.G532V

Zwei der 62 analysierten Patienten (n=2/62) sind homozygote Träger der p.G532V-Mutation (Tabelle 4-10). Der Basenaustausch von Guanin (G) zu Thymin (T) an der Stelle 1595 führt zu einem Austausch der Aminosäure Glycin (G) zu Valin (V) an Stelle 532 des von *BBS6* codierten Proteins. Abbildung 4-23 zeigt Ausschnitte der Sequenzanalyse der Familienmitglieder der Familie 2038 und einer gesunden Kontrolle. Der Patient 2125 zeigt die Mutation p.G532V in homozygoter Form. Seine Eltern 2122 und 2123 sind heterozygote Träger der Mutation. Die gesunde Kontrolle ist homozygoter Wildtypträger.

Tabelle 4-10: Die Mutation p.G532V im analysierten Patientenkollektiv

Familiennummer	DNA-Nummer	Familienmitglied	BBS	Genotyp
2038	2122	Vater	-	
	2125	Patient	+	
	2123	Mutter	-	
2033	2087	Patient	+	

 = heterozygoter Träger (532GV),  = homozygoter Träger (532VV)

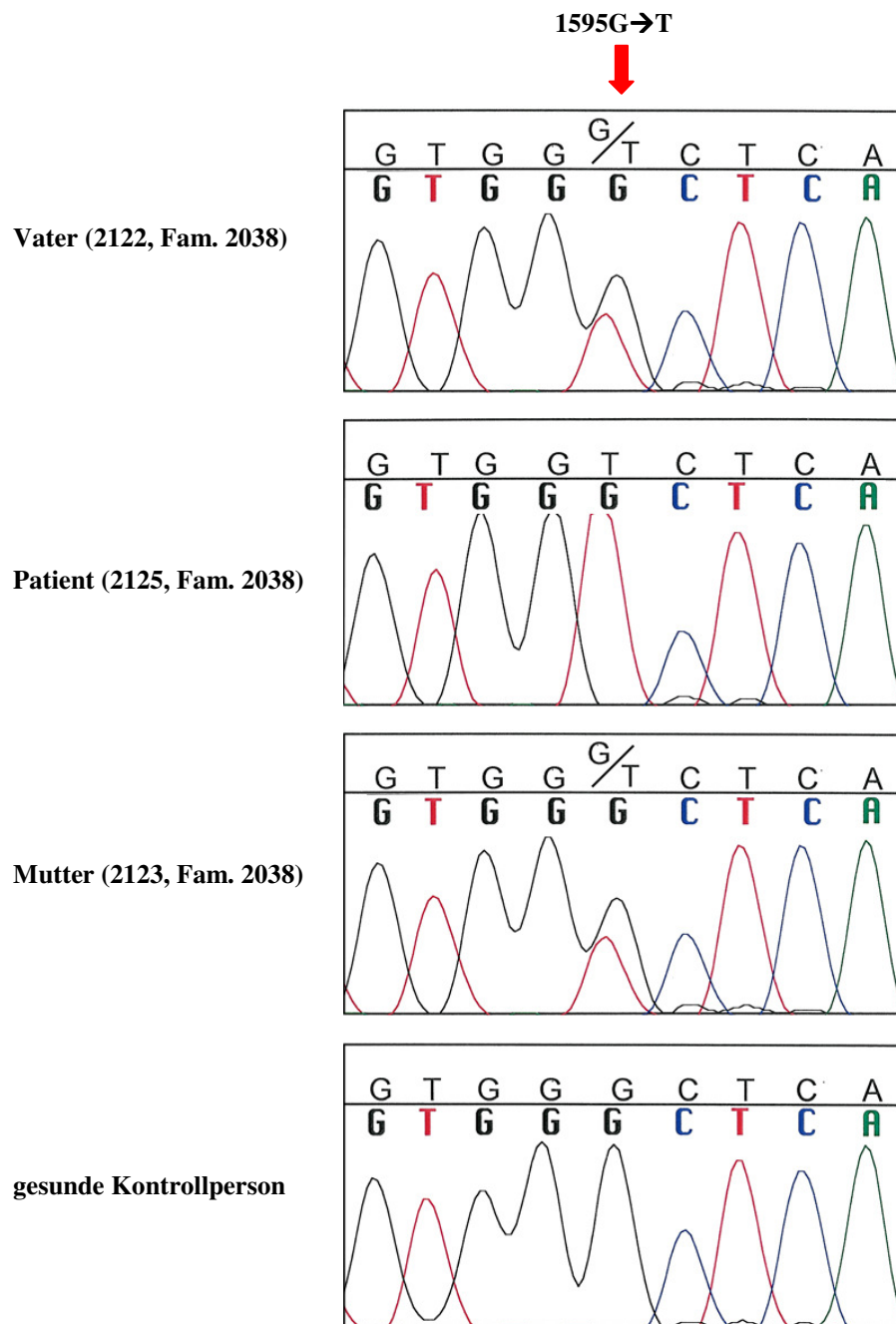


Abbildung 4-23: Ausschnitte der Sequenzanalyse des Exons 6c der Familienmitglieder der Familie 2038 und einer gesunden Kontrolle. Der Vater 2122 und die Mutter 2123 sind heterozygote Träger, der Patient 2125 homozygoter Träger des Basenaustausches 1595G→T (p.G532V-Mutation). Die gesunde Kontrollperson zeigt den homozygoten Wildtyp.

5 Diskussion

5.1 Methodendiskussion

5.1.1 Die SSC-Analyse als Screeningmethode für Sequenzvarianten

Als Screeningmethode dieser Studie wurde die single-strand conformational analysis (SSCA) eingesetzt. Bei der SSCA handelt es sich um eine Gelelektrophorese, bei der das Laufverhalten von Sekundärstrukturen denaturierter, einzelsträngiger DNA auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) beurteilt wird. Nach Amplifizierung für die SSCA geeignet großer DNA-Abschnitte (150-350 bp) werden die bei 95°C denaturierten PCR-Produkte auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel (PAA-Gel) aufgetragen. Die durch die Denaturierung entstandenen Einzelstränge nehmen im Gel durch Basenpaarung mit sich selbst komplexe Konformationen (Sekundärstrukturen) an, die von der Nukleinsäuresequenz und der Temperatur abhängen. Schon eine einzige mutierte Base kann zu veränderten Laufeigenschaften des Fragments im Gel führen. Durch Silberfärbung können die DNA-Fragmente auf dem Gel sichtbar gemacht und beurteilt werden. Wie gut sich die DNA-Proben während der Gelelektrophorese auftrennen ist abhängig von den SSCA-Bedingungen, die für jedes einzelne PCR-Produkt ermittelt werden müssen. Zu den SSCA-Bedingungen gehören: DNA-Konzentration und Menge, Spannung, Laufzeit, Pufferkammertemperatur, sowie das verwendete PAA-Gel (8%, 10% oder 12%). Statistisch konnte nachgewiesen werden, dass nur 70% aller vorhandenen Sequenzvarianten mit der SSCA gefunden werden können.

Für diese Studie wurden die DNA-Proben von 62 Patienten mit 10 verschiedenen im *BBS6*-Gen liegenden Primerpaaren amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf insgesamt 110 PAA-Gele aufgetragen. Zeigten die DNA-Proben der Patienten Auffälligkeiten im Laufmuster, wurden in einem zweiten Schritt die auffälligen Proben mit DNA-Proben der Familienmitglieder erneut analysiert. Erst nachdem die DNA-Proben der Patienten mindestens in zwei Analysen ein verändertes Laufmuster zeigten wurde eine Sequenzanalyse des jeweiligen PCR-Produktes durchgeführt.

Die SSC-Analyse diente somit als Screen auf Sequenzvarianten in *BBS6* und minimierte dadurch die Anzahl der Proben zu der im Vergleich zur SSC-Analyse teureren Sequenzanalyse. Andere Arbeitsgruppen verzichteten auf den Zwischenschritt der SSC-Analyse und führten eine direkte Sequenzanalyse der DNA-Proben durch (Fan et al. 2004). Somit ist als Alternative zur SSC-Analyse mit nachfolgender Sequenzanalyse die direkte Sequenzanalyse zu sehen.

Die SSC-Analyse ist eine Methode mit Vor- und Nachteilen. Als Vorteil sei der hohe Probendurchsatz pro Tag zu nennen. Die Planung, Dokumentation, Durchführung bei den Pufferkammertemperaturen 10°C und 20°C und Auswertung von 84 DNA-Proben konnte an einem Tag realisiert werden. Bei optimal amplifizierten PCR-Produkten war die Ausfallquote der DNA-Proben auf dem Gel äußerst niedrig. Die relativ kurze Einarbeitungszeit und die leichte Handhabung der Apparaturen und Gele ist ein weiterer Vorteil der SSC-Analyse. In den anschließenden Sequenzanalysen konnten allen bei der SSCA wiederholt auffälligen DNA-Proben eine Sequenzvariante nachgewiesen werden. Auch der wirtschaftliche Aspekt spricht für die SSC-Analyse als Screeningmethode für Sequenzvarianten.

Nachteile der SSCA ist die mangelnde Reproduzierbarkeit von Ergebnissen und die Detektionsrate von 70%. Die vielen äußeren und für jedes PCR-Produkt speziellen Bedingungen machen eine Standardisierung der Abläufe schwierig. Die SSCA kann Fragen zu Art und Lage der Sequenzvarianten nicht beantworten.

Die Detektionsrate der SSCA lässt sich durch die Verwendung verschiedener Pufferkammertemperaturen erhöhen. In dieser Studie wurden alle DNA-Proben jeweils bei 10°C und 20°C Pufferkammertemperatur analysiert. Die stille Mutation p.I178I und der Polymorphismus p.R517C konnten bei beiden Temperaturen bei allen betroffenen DNA-Proben nachgewiesen werden. Die Mutation p.Y37C zeigte sich vorwiegend bei 20°C und die Mutation p.G532V hauptsächlich bei 10°C. Die Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe mit der SSCA zeigen, dass durch die Verwendung von PAA-Gele unterschiedlicher Konzentration die Sensitivität zusätzlich verbessert werden kann. Für diese Studie wurden ausschließlich 12% PAA-Gele benutzt. Die übrigen SSCA-Bedingungen (DNA-Konzentration, Spannung, Laufzeit) wurden zu Beginn dieser Studie für jedes PCR-Produkt ermittelt.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen weiterhin, dass die Sekundärstruktur nicht nur von den äußeren Bedingungen abhängig ist, sondern scheinbar auch zufällige Basenpaarungen und dadurch unterschiedliche Laufverhalten im Gel eine Rolle spielen. Die SSC-Analysen in Exon 3 verdeutlichen dies (Abschnitt 4.2.2.1.1). Die DNA-Proben der Patienten 2031, 2185 und 2125 zeigten, im Vergleich zu den anderen Proben, ein auffälliges Laufmuster auf dem Gel. Daraufhin wurden diese Proben erneut zusammen mit Proben ihrer Familienmitglieder aufgetragen. Nur die Probe des Patienten 2125 und die Proben seiner Eltern zeigten wiederholt ein auffälliges Laufmuster. Weder die DNA-Proben der Patienten 2031, 2185, noch derer Familienmitglieder zeigten bei der Wiederholung eine Auffälligkeit. Die Sequenzanalyse der DNA-Probe der Patientin 2185 war ebenso unauffällig. Dieses Beispiel soll exemplarisch die Schwierigkeit der Reproduzierbarkeit von SSC-Analysen darstellen. Es zeigt, dass es sehr hilfreich ist bei auffälligen Patienten-Proben eine SSC-Analyse zusammen mit DNA-Proben der

Familienmitglieder durchzuführen. Zeigen die Proben bei der Wiederholung weder beim Patienten, noch bei den Familienmitgliedern Auffälligkeiten, können Sequenzvarianten zwar nicht endgültig ausgeschlossen werden, sind dann aber nach unseren Erfahrungen unwahrscheinlich.

Auch wenn ein auffälliges Laufmuster bei DNA-Proben entdeckt wird, ist es nicht möglich zu sagen, welche Sequenzvariante dafür verantwortlich ist. Da auch die Frage nach der Lage der Sequenzvariante innerhalb der DNA nicht mit der SSCA geklärt werden kann, muss der SSC-Analyse eine Sequenzanalyse des auffälligen PCR-Produktes folgen.

5.1.2 Direkte Sequenzanalyse als Alternative zur SSC-Analyse

Die direkte Sequenzierung aller Patienten-Proben als Alternative zu dem von uns benutzen Verfahren zu sehen fällt schwer. Aus wirtschaftlichen Gründen ist diese Möglichkeit von vornherein ausgeschlossen und wird an dieser Stelle nur theoretisch diskutiert.

Da die SSCA nicht in der Lage ist eine Aussage über Art und Lage der Sequenzvariante zu machen, muss im Anschluss an die SSCA immer eine Sequenzanalyse der auffälligen Proben durchgeführt werden.

Der Zeitaufwand der Sequenzanalyse von 62 Proben mit zehn verschiedenen Primerpaaren ist nicht mit dem der SSC-Analyse zu vergleichen. Die Vorbereitung der Sequenzierung übersteigt, mit der Durchführung der PCR und der Aufreinigung des Produktes alleine schon den Zeitaufwand einer kompletten SSC-Analyse. Nicht zu vergessen ist, dass die Proben jeweils getrennt mit dem Forward- und dem Reverse-Primer amplifiziert werden müssen. Das verdoppelt die Anzahl der Proben, die bearbeitet und sequenziert werden müssen.

Trotz penibelster Vorbereitung der Proben kam es bei den in dieser Studie sequenzierten Proben beim ersten Durchgang der Sequenzanalyse bei acht von 62 Proben (31 DNA-Proben, jeweils mit Forward- und Reverse-Primern amplifiziert) zu Ausfällen. Dies entspricht einer Ausfallshäufigkeit von 12%. Ist die Auswertung einer SSC-Analyse innerhalb von Minuten per Blickdiagnose abgeschlossen, ist die Auswertung der Sequenzen nur mit Hilfe von Computerprogrammen durchführbar.

Vorteil der Sequenzierung ist die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Art und Lage der Mutation sind genau und direkt bestimmbar.

5.2 Klinische und epidemiologische Diskussion

5.2.1 Schwierigkeiten der klinischen Diagnose des Bardet-Biedl-Syndroms

Die Diagnose des Bardet-Biedl-Syndroms (BBS) basiert auf den klinischen Zeichen des Patienten. Eine molekulargenetische Untersuchung zur weiteren Bestätigung kann nur in beschränktem Ausmaß angeboten werden, da nur auf die Mutation p.M390R in *BBS1* getestet wird. Dies ist sinnvoll, da es sich bei der p.M390R-Mutation um die in der kaukasischen Bevölkerung häufigste Mutation handelt, für die mit der Restriktionsspaltung durch die Restriktionsendonuklease *AvaII* eine unaufwendige Nachweismethode zur Verfügung steht. Eine Untersuchung auf die seltenen Mutationen in *BBS2-BBS8* ist mit den heute zur Verfügung stehenden Methoden (Sequenzierung jeder einzelnen Mutation) zu kosten- und arbeitsaufwendig.

Die inter- und intrafamiliäre Variabilität, mit der das Bardet-Biedl-Syndrom auftritt, machen die Diagnosestellung oftmals sehr schwierig. Um sie zu präzisieren wurden Haupt- und Nebenkriterien definiert (Beales et al. 1999). Zu den Hauptkriterien zählen Retinitis pigmentosa, postaxiale Polydaktylie, Adipositas, mentale Retardierung, Hypogonadismus und Nierenfehlbildungen (Tabelle 1-2).

Vier Hauptkriterien alleine oder drei Hauptkriterien und zwei Nebenkriterien (Tabelle 1-2) sollten erfüllt sein, um ein Bardet-Biedl-Syndrom in Erwägung zu ziehen. Die Erfüllung der Kriterien, insbesondere im Kleinkind- und Säuglingsalter wird durch die Tatsache erschwert, dass die Merkmale Retinitis pigmentosa oder Adipositas erst im jugendlichen Alter auftreten können.

Das Vorhandensein einer postaxialen Polydaktylie sollte an ein Bardet-Biedl-Syndrom denken lassen. Die postaxiale Polydaktylie ist das erste klinische Merkmal, welches schon direkt nach der Geburt ohne invasive Untersuchungsmethoden per Blickdiagnose festzustellen ist und sich in 90% aller BBS-Fälle ausprägt (Beales et al. 1999). Lassen sich weitere Merkmale eines BBS nachweisen ist die Indikation für regelmäßige Kontrolluntersuchungen der Augen und Nieren gegeben. Eine abschließende und sichere klinische Diagnose ist erst nach der Pubertät des Patienten zu stellen.

Das in der Kasuistik dieser Studie beschriebene Geschwisterpaar kann die intrafamiliäre Variabilität des BBS nicht bestätigen. Als gemeinsame Merkmale zeigen die Geschwister die Symptome Retinitis pigmentosa, Adipositas, postaxiale Polydaktylie und Sprachverzögerung. Der Patient 2192 hat zusätzlich eine Brachydaktylie und einen Hypodontismus. Die leichte mentale Beeinträchtigung, die progredient verlaufende Wesensveränderung und das viel schwächere Sehvermögen lassen die Schwester 2185 im Vergleich zu ihrem Bruder 2192 schwerer vom BBS betroffen erscheinen. Diese drei Symptome lassen sich dem BBS zuordnen, könnten aber auch infolge des erhöhten Hirndrucks durch den Pseudotumor cerebri bei der Schwester 2185 verursacht sein, der

in der Neurologischen Klinik Ulm diagnostiziert wurde. Beide Geschwister haben eine abgeschlossene Berufsausbildung. Eine Umschulung vom Winzermeister zum Verwaltungsfachangestellten ermöglichen es dem Patienten 2192 im Gegensatz zu seiner Schwester trotz seiner Sehinderung am Berufsleben teilzunehmen. Seine Schwester 2185 ist zur Zeit nicht in der Lage ihrem erlernten Beruf als Hauswirtschaftsmeisterin nachzugehen.

Differentialdiagnosen des Bardet-Biedl-Syndroms sind insbesondere Syndrome mit den Symptomen postaxiale Polydaktylie und Retinitis pigmentosa (allein oder in Kombination) (Tabelle 5-1). Mutationen in *BBS6* führen zur Ausprägung des McKusick-Kaufman-Syndroms (MKKS). Aus diesem Grund lässt es sich nicht getrennt vom Bardet-Biedl-Syndrom betrachten, sondern muss als Teil des Bardet-Biedl-Syndroms gesehen werden und entfällt als Differentialdiagnose.

Tabelle 5-1: Differentialdiagnosen des Bardet-Biedl-Syndroms

OMIM	Syndrom	Symptome
245800	Laurence-Moon S.	Retinitis pigmentosa, Hypogonadismus, Entwicklungsverzögerung
210350	Biemond II S.	postaxiale Polydaktylie, Adipositas, Iriskolobom, Hypogenitalismus, Entwicklungsverzögerung
203800	Alstrom S.	Retinitis pigmentosa, Adipositas, Diabetes mellitus, Schwerhörigkeit
249000	Meckel S.	postaxiale Polydaktylie, Zystennieren, Encephalocoele
601803	Pallister-Killian S.	postaxiale Polydaktylie, Adipositas, Hypogenitalismus, Zystennieren, mentale Retardierung
146510	Pallister-Hall S.	postaxiale Polydaktylie, Hypogenitalismus, Nierendysplasien
225500	Ellis-Van-Creveld S.	postaxiale Polydaktylie, angeborene Herzfehler, mentale Retardierung
311200	Orofaciodigitales S.	unilaterale präaxiale Polydaktylie, im Erwachsenenalter Nierenzysten, variable mentale Retardierung

5.2.2 Konsanguinität als Ursache gehäuferten Auftretens des Bardet-Biedl-Syndroms in bestimmten Populationen

Die Häufigkeiten, mit der das BBS auftritt, unterscheiden sich deutlich in den verschiedenen Bevölkerungsgruppen. In Nordamerika und Europa ist das BBS selten (Katsanis 2004).

Häufig wurde das BBS in einer isolierten Neufundlandpopulation beobachtet. Die Besiedlung durch wenige englische Familien (Gründereffekte) wurde dafür verantwortlich gemacht (Green et al. 1989). Innerhalb der Beduinenvölker Kuwaits konnte das BBS ebenfalls sehr häufig nachgewiesen werden. Der Verwandtschaftsgrad innerhalb der Beduinenvölker beträgt etwa 87% (Teebi 1994).

Bei den 62 dieser Studie zur Verfügung gestandenen Patienten handelt es sich um 54 deutsche BBS-Patienten und 8 BBS-Patienten aus der Türkei. Bei zwei der deutschen

Familien ist die Verwandtschaft der Eltern wahrscheinlich. Die Eltern des BBS-Patienten aus der Kasuistik dieser Studie sind sowohl über die väterliche Linie, als auch über die mütterliche Linie Vettern 4. Grades. Die Eltern der Mutter sind wiederum über deren väterlichen und mütterlichen Linie Vettern 2. Grades. Eine weitere deutsche Familie stammt aus dem gleichen kleinen Ort an der Mosel. Ihr Verwandtschaftsgrad war nicht zu bestimmen. Fünf der neun türkischen Elternpaare sind verwandt. Die verwandten türkischen Eltern sind vorwiegend Vettern 1. und 2. Grades.

5.3 Mutationen in den Genen *BBS1* und *BBS6*

Bisher konnten Mutationen in allen charakterisierten BBS-Genen nachgewiesen werden (Tabelle 1-3). In *BBS1* wurden bis heute etwa 50 Mutationen gefunden. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Punktmutationen, insbesondere Aminosäureaustauschmutationen und Stoppmutationen. Die Mutation p.M390R in *BBS1* Exon 12 ist mit einer Allelfrequenz von 14% für das mutante Allel die häufigste in der Literatur beschriebene Mutation (Tabelle 1-4). Der Basenaustausch von Cytosin (C) zu Guanin (G) in der DNA von BBS-Patienten führt zum Austausch von Methionin (M) zu Arginin (R) in dem von *BBS1* codierten Protein. Die p.M390R-Mutation tritt bei Betroffenen in homozygoter und heterozygoter Form auf. Zum Nachweis der p.M390R-Mutation steht mit der Restriktionsspaltung durch die Restriktionsendonuklease *AvaII* eine zeit- und arbeitsunaufwendige Methode zur Verfügung.

Für diese Studie wurden 62 Patienten (54 Deutsche, 8 Türken) mit der Restriktionsendonuklease *AvaII* auf ihren Genträgerstatus für die p.M390R-Mutation in *BBS1* getestet. Bei den analysierten Patienten sind 89% (n=55/62) homozygote Wildtypträger, 3% (n=2/62) heterozygote Träger der p.M390R-Mutation und 8% (n=5/62) homozygote Träger der p.M390R-Mutation. Somit liegt die Allelfrequenz für das mutante Allel in der für dieser Studie analysierten Population bei 10% und bestätigt internationale Ergebnisse (Tabelle 5-2).

Tabelle 5-2: Häufigkeit der p.M390R-Mutation in *BBS1* im internationalen Vergleich

	International	Marburg
Anzahl analysierter Patienten	259	62
Anzahl mutanter Allele	74	12
Allelfrequenz	14%	10%

Alle Träger der p.M390R-Mutation dieser Studie stammen aus Deutschland. Die türkischen BBS-Patienten sind durchgehend Träger des homozygoten Wildtyps. Studien zur Häufigkeit der p.M390R-Mutation in der türkischen Population existieren nicht. Das Ergebnis dieser Studie zeigt aber, dass die türkische Population innerhalb der kaukasischen Bevölkerungsgruppe gesondert betrachtet werden muss.

Erkrankungen, bei denen die molekulargenetischen Ursachen viel genauer bekannt sind, als beim BBS bestätigen die Sonderstellung der Türken in der kaukasischen Population. Als Beispiel sei die Mukoviszidose, auch zystische Fibrose genannt, zu erwähnen. Die Mukoviszidose ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die auf Mutationen des auf Chromosom 7 liegenden *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane regulator) Gens zurückzuführen ist. Mit einer Häufigkeit von 70% ist die Mutation $\Delta F508$ für die Ausprägung der Mukoviszidose in der westeuropäischen Population verantwortlich (Kerem et al. 1989). Studien zur Untersuchung der Häufigkeit der $\Delta F508$ -Mutation bei Türken zeigen, dass nur 27% der türkischen Mukoviszidose-Patienten Träger der











Δ F508-Mutation sind. Daraus wurde geschlossen, dass die türkischen Mukoviszidose-Patienten vorwiegend Träger anderer Mutationen sein müssen (Hundrieser et al. 1990).

Mutationen in *BBS6* (*MKKS*) führen zur Ausprägung des McKusick-Kaufman-Syndroms. Zusätzlich konnten bei 4-7% aller BBS-Patienten Mutationen in *BBS6* nachgewiesen werden (Mykytyn et al. 2002). Es sind bisher etwa 30 Mutationen in *BBS6* bekannt, vorwiegend Punktmutationen in Form von Aminosäureaustauschmutationen und Stopppmutationen. Eine Mutation, die so häufig ist wie die *BBS1* p.M390R-Mutation ist in *BBS6* nicht bekannt (Tabelle 1-5). Die geeignetste Methode zur Detektion von Sequenzvarianten ist die Sequenzanalyse im Anschluss einer SSC-Analyse. Diese Methode ist im Vergleich zu dem Restriktionsverdau zur Genotypisierung der p.M390R-Mutation sehr zeit- und arbeitsaufwendig.

In dieser Studie wurden die DNA-Proben von 62 BBS-Patienten auf Sequenzvarianten in *BBS6* analysiert. Die Sequenzanalyse der DNA von insgesamt 20 bei der SSC-Analyse auffälligen BBS-Patienten konnte vier Sequenzvarianten zeigen. Zwei der Sequenzvarianten liegen in *BBS6* Exon 3 (p.Y37C und p.I178I) und zwei in *BBS6* Exon 6 (p.R517C und p.G532V). Alle Sequenzvarianten sind bereits in der Literatur beschrieben worden. Die Punktmutationen p.Y37C und p.G532V sind Aminosäureaustauschmutationen mit pathologischem Wert. Bei der p.I178I-Mutation handelt es sich um eine stille Mutation, die zwar einen Basenaustausch in der DNA, aber keinen Aminosäureaustausch im Protein verursacht. Die Sequenzvariante p.R517C ist ein Polymorphismus, der mit einer Allelfrequenz von 11% in der Normalbevölkerung vorkommt.

Die Mutation p.Y37C wurde in dieser Studie bei der BBS-Patientin 2087 in heterozygoter und bei dem BBS-Patienten 2125 in homozygoter Form gefunden. Die BBS-Patienten 2087 und 2125 sind ebenfalls die einzigen homozygoten Träger der p.G532V-Mutation in dem von uns untersuchten Patientenkollektiv. Heterozygote Träger der p.G532V-Mutation sind nicht vorhanden. Zusätzlich tragen beide BBS-Patienten auch die stille Mutation p.I178I in heterozygoter Form (Tabelle 5-3).

Tabelle 5-3: Die BBS-Patienten 2087 und 2125 mit den bei ihnen in *BBS6* gefundenen Mutationen

Familien-nummer	DNA-Nummer	Familien-mitglied	BBS	p.Y37C	p.G532V	p.I178I	Mutante Allele
2033	2087	Patientin	+				2
	2038						
2038	2122	Vater	-			nd	2
	2125	Patient	+				2
	2123	Mutter	-			nd	2

 = homozygoter Träger der Mutation,  = heterozygoter Träger der Mutation, nd = nicht getestet

Die stille Mutation p.I178I konnte bei den von uns untersuchten BBS-Patienten bei 10 weiteren heterozygoten Trägern (Gesamt: n=12/62) gezeigt werden. Homozygote Träger der p.I178I wurden nicht gefunden. Der Polymorphismus p.R517C wurde in dieser Studie bei acht heterozygoten Trägern (n=8/62) entdeckt. Homozygote Träger des Polymorphismus p.R517C wurden nicht gefunden.

Die Träger der Aminosäureaustauschmutationen p.Y37C und p.G532V mit den DNA-Nummern 2087 und 2125 sind deutscher Abstammung. Türkische Träger dieser beiden Mutationen konnten nicht nachgewiesen werden. Ein gehäuftes Auftreten der übrigen Sequenzvarianten bei Türken konnte in dieser Studie ebenfalls nicht beobachtet werden.

In der internationalen Literatur konnten BBS-Patienten gezeigt werden, die nicht nur Mutationen in einem einzigen BBS-Gen (monogen) haben, sondern auch Kombinationen von Mutationen in zwei verschiedenen BBS-Genen (digen), darunter auch Kombinationen von Mutationen in *BBS1*, insbesondere der p.M390R-Mutation, zusammen mit Mutationen in *BBS6* (Katsanis 2004). Die Genotypisierung zum Nachweis der p.M390R-Mutation war bei allen Patienten dieser Studie mit einer Mutation in *BBS6* unauffällig. Dieses Ergebnis schließt digen betroffene BBS-Patienten in dem von uns untersuchten Patientenkollektiv nicht aus, da die BBS-Patienten ebenso gut eine andere als die p.M390R-Mutation in *BBS1* in Kombination mit einer Mutation in *BBS6* tragen können.

5.4 Molekulargenetische Ursachen, die zur Ausprägung des Bardet-Biedl-Syndroms führen

Das Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) wird durch Mutationen in den BBS-Genen verursacht. In allen charakterisierten BBS-Genen konnten bisher Mutationen gefunden werden. Mutationsscreens konnten BBS-Patienten mit Mutationen in nur einem BBS-Gen (monogen) und BBS-Patienten mit Mutationen in zwei verschiedenen BBS-Genen (digen) zeigen.

Monogen betroffene Patienten sind auffällig oft Patienten mit Mutationen in *BBS1*. Besonders häufig sind sie Träger der homozygoten p.M390R-Mutation in *BBS1*. In seltenen Fällen konnte die p.M390R-Mutation bei BBS-Patienten auch in der heterozygoten Form gefunden werden. Es werden zwei Arten monogen betroffener Patienten beschrieben. Es wird berichtet von BBS-Patienten, die Träger von nur einer heterozygoten Mutation sind (ein mutantes Allel). Weiterhin sind BBS-Patienten bekannt, die entweder Träger einer homozygoten Mutation (zwei mutante Allele) oder Träger einer compound heterozygoten Mutation sind (zwei mutante Allele) (Katsanis 2004).

Tabelle 5-4 zeigt das Ergebnis der p.M390R-Mutationssuche in *BBS1* von zwei ausgewählten BBS-Patienten dieser Studie. Der BBS-Patient 2060 ist homozygoter Träger der p.M390R-Mutation und der BBS-Patient 2160 heterozygoter Träger der p.M390R-Mutation.

Tabelle 5-4: Ergebnisse der p.M390R-Mutationssuche der BBS-Patienten 2060 und 2160

Familien-nummer	DNA-Nummer	BBS	p.M390R	Mutante Allele (Gesamt)
2025	2060	+	■	2
	2160	+	▨	1

■ = homozygoter Träger der p.M390R-Mutation

▨ = heterozygoter Träger der p.M390R-Mutation

Die Sequenzanalysen von DNA-Proben der BBS-Patienten des von uns analysierten Patientenkollektivs für *BBS6* zeigen 12 BBS-Patienten mit der heterozygoten p.I178I-Mutation. Die p.I178I-Mutation ist eine stille Mutation, die keinen pathologischen Wert besitzt und deshalb nur eingeschränkt als Beispiel für monogen betroffene BBS-Patienten dienen darf.

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse in *BBS6* der DNA-Proben der Patienten 2087 und 2125 zeigen eine besondere Konstellation von Mutationen in *BBS6*. Die Patientin 2087 und der Patient 2125 sind Träger von drei unterschiedlichen Mutationen in *BBS6* (Tabelle 5-3). Ein ähnlicher Fall ist bislang nicht in der Literatur erwähnt worden, ist aber wiederum durch das Vorhandensein der stillen p.I178I-Mutation nur eingeschränkt

zu bewerten. Die p.M390R-Mutation in *BBS1* konnte bei diesen Patienten nicht gefunden werden.











Neben BBS-Patienten mit Mutationen in einem einzigen BBS-Gen werden digene Mutationsträger beschrieben. Digen bedeutet, dass eine Mutation in einem der BBS-Gene in Kombination mit einer Mutation in einem anderen BBS-Gen auftritt. An digen betroffenen Patienten konnte herausgefunden werden, dass die verschiedenen Kombinationen zweier von Mutationen betroffener BBS-Gene unterschiedlich häufig vorkommen. Häufig wurden Mutationen in *BBS6* in Kombination mit Mutationen in einem der anderen BBS-Gene gefunden. Es wurden bereits BBS-Patienten beschrieben, die Mutationen in *BBS1*, insbesondere der p.M390R-Mutation, zusammen mit Mutationen in *BBS6* tragen (Katsanis 2004).


Digene Träger von Mutationen in den BBS-Genen werden aufgrund der Anzahl der betroffenen Allele zusätzlich eingeteilt. Ein Gen wird von zwei Allelen kodiert. Ein BBS-Patient mit zwei homozygoten Mutationen in zwei verschiedenen BBS-Genen trägt vier mutante Allele, ein BBS-Patient mit zwei heterozygoten Mutationen in zwei verschiedenen Genen zwei mutante Allele und ein BBS-Patient mit einer homozygoten Mutation in einem BBS-Gen und einer weiteren heterozygoten in einem anderen Gen trägt drei mutante Allele.


Tabelle 5-5 gibt eine exemplarische Übersicht über die verschiedenen bisher beschriebenen Arten digen betroffener BBS-Patienten. *BBSn* und *BBSm* bezeichnen zwei verschiedene nicht näher bezeichnete BBS-Gene.

Diese Studie konnte ausschließlich monogen betroffene BBS-Patienten zeigen. Dieses Ergebnis schließt digen betroffene BBS-Patienten in dem von uns untersuchten Patientenkollektiv nicht aus, da die BBS-Patienten ebenso gut eine andere als die p.M390R-Mutation in *BBS1* in Kombination mit einer Mutation in *BBS6* tragen können.

Tabelle 5-5: Beispiele aus der Literatur für digen betroffene BBS-Patienten

BBS-Patient	<i>BBSn</i>	<i>BBSm</i>	Mutante Allele	Literatur
Patient 1			2	1
Patient 2			3	1
Patient 3			3	3
Patient 4			4	4
Patient 5			4	2

 = homozygoter Träger einer Mutation (2 mutante Allele)

 = heterozygoter Träger einer Mutation (1 mutantes Allel)

Literatur: 1) Katsanis et al. 2001b

2) Katsanis et al. 2002

3) Katsanis 2004

4) Beales et al. 2003





5.5 Erkenntnisse für die genetische Beratung betroffener BBS-Familien



Das Bardet-Biedl-Syndrom ist ein in seiner klinischen Ausprägung inhomogenes Syndrom, das auf Mutationen in den bisher bekannten acht BBS-Genen zurückzuführen ist und autosomal-rezessiv vererbt wird. Bislang ist nicht bekannt welche Mutationskombinationen zu welchem Phänotyp führen.

Durch Kopplungsanalysen in Familien mit mehreren Betroffenen konnten acht BBS-Gene lokalisiert und charakterisiert werden (*BBS1-BBS8*). Studien in Familien mit BBS-Patienten, die keine Kopplung zu den bekannten BBS-Genen aufweisen, deuten darauf hin, dass mindestens ein weiterer Genlocus existiert (Ansley et al. 2003).

Lange Zeit galt das BBS als ein klassisch autosomal-rezessiv-vererbtes Syndrom. Eine homozygote Mutation in einem der BBS-Gene sollte der Ausprägung des BBS zugrunde liegen (Katsanis et al 2001). Tabelle 5-6 zeigt das Ergebnis der p.M390R-Mutationssuche in der Familie die als Kasuistik dieser Studie näher beschrieben wurde (Kapitel 3). Die betroffenen Geschwister sind jeweils Träger der p.M390R-Mutation in homozygoter Form. Die gesunden Eltern sind klassischerweise heterozygote Träger der p.M390R-Mutation.

Tabelle 5-6: Ergebnis der Genotypisierung der p.M390R-Mutation in der Familie 2034

Familiennummer	DNA-Nummer	Familienmitglied	BBS	Genotyp
2034	2190	Vater	-	
	2185	Sohn	+	
	2192	Tochter	+	
	2191	Mutter	-	

 = heterozygot (390MR) ,  = homozygot (390RR)

Im Zuge fortschreitender Forschungen konnten BBS-Patienten entdeckt werden, die neben einer Mutation in einem BBS-Gen eine zusätzliche Mutation in einem weiteren BBS-Gen trugen. Folglich ging man davon aus, dass das BBS den Mendelschen Regeln abweichend digen vererbt wird (Beales et al. 2003). Digene Erbgänge konnten zuvor schon bei anderen Erkrankungen gezeigt werden. Als Beispiel sei die angeborene Taubheit zu nennen. In dieser Studie wurden Patienten auf die p.M390R-Mutation in *BBS1* und auf Sequenzvarianten in *BBS6* analysiert. Es konnten keine digen betroffenen Patienten nachgewiesen werden. Studien unserer Arbeitsgruppe zu dem Vorhandensein von Sequenzvarianten in den übrigen BBS-Genen bei diesen BBS-Patienten werden derzeit durchgeführt.

Studien in Familien mit mehreren betroffenen Kindern zeigten, dass digen betroffene BBS-Patienten aufgrund der Anzahl der betroffenen Allele unterschiedliche Phänotypen aufwiesen. Abbildung 5-1 zeigt das Beispiel einer Familie aus einer Studie, die versuchte den Phänotyp von BBS-Patienten mit ihrem Genotyp in Verbindung zu

bringen. Beide Geschwister sind Träger von zwei mutanten Allelen in *BBS1*. Die vom BBS deutlich schwerer betroffene Tochter trägt zusätzlich noch ein mutantes Allel in *BBS6*. Anhand solcher Beispiele wurde der triallelische Erbgang postuliert (Katsanis et al. 2001a)

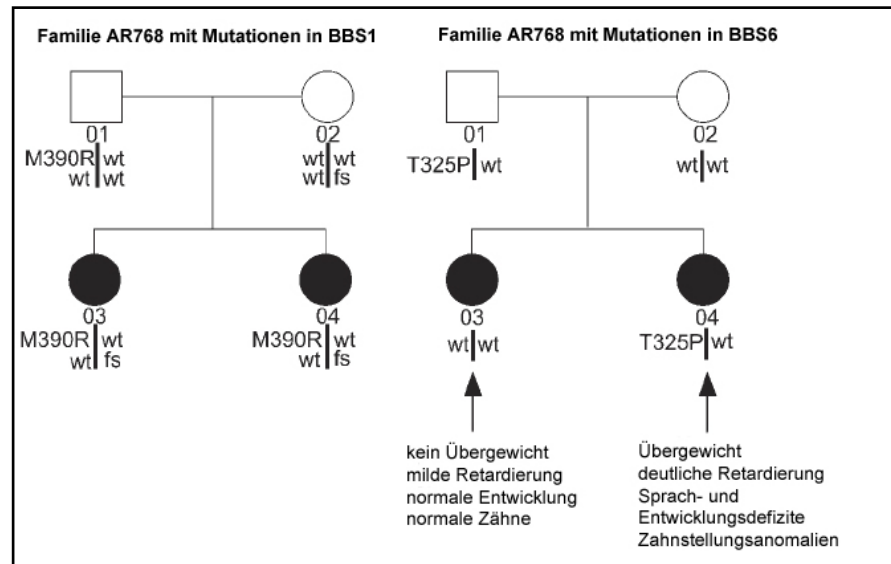


Abbildung 5-1: Stammbaum der Familie AR768 (Katsanis et al. 2001)

Beispiele von BBS-Patienten mit zwei homozygoten Mutationen in verschiedenen BBS-Genen (vier mutante Allele) lassen aber auch den triallelischen Erbgang fragwürdig erscheinen (Katsanis 2004). Ein oligogener Erbgang erscheint bei dem heutigen Stand der Forschung als der beste Erklärungsansatz.

Die Wahrscheinlichkeit des Vererbens des Bardet-Biedl-Syndroms (BBS), sowie die Vorhersagbarkeit über den Verlauf eines BBS spielen eine zentrale Rolle in der genetischen Beratung von Betroffenen und deren Familien. Probleme bei der Beratung ergeben sich durch die offenen Fragen in Bezug auf Anzahl der vorhandenen Gene, dem des BBS zugrundeliegenden Erbganges und der Korrelation zwischen Phänotyp und Genotyp.

Bislang werden BBS-Patienten routinemäßig nur auf die p.M390R-Mutation, der mit einer Allelfrequenz von 10% bei BBS-Patienten der deutschen Population (Ergebnis dieser Studie) häufigsten Mutation, untersucht. Somit werden hauptsächlich Familien genetische Beratung erfahren, die von dieser Mutation betroffen sind. Die Erhebung des Stammbaums und die Genotypisierung möglichst vieler Familienmitglieder sollte zeigen können, ob ein klassischer autosomal-rezessiver Erbgang vorliegt. Ist dies der Fall, ist die Wahrscheinlichkeit von Kindern mit dem BBS bei für die Mutation p.M390R heterozygoten Eltern mit 25% anzugeben. Die Wahrscheinlichkeit gesunder heterozygoter Träger der p.M390R-Mutation mit einem Partner, der den homozygoten Wildtyp trägt, erkrankte Kinder zu bekommen ist weit unter 1% einzustufen.

6 Zusammenfassung

Das Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) ist eine klinisch und genetisch heterogene Multisystemerkrankung, die durch Mutationen in den acht bisher bekannten BBS-Genen (*BBS1-BBS8*) ausgelöst wird. Die Vererbung ist autosomal-rezessiv. In internationalen Studien konnte die häufigste Mutation p.M390R in *BBS1* Exon 12 mit einer Allelhäufigkeit von 14% bei BBS-Patienten gefunden werden. Da bisher zu deutschen BBS-Patienten keine Ergebnisse zur Häufigkeit der p.M390R-Mutation bekannt sind, sollte diese Studie die Anzahl der p.M390R-Mutationsträger in einem Kollektiv von 62 BBS-Patienten bestimmen. Zur Genotypisierung heterozygoter und homozygoter Träger der p.M390R-Mutation wurde mit der Restriktionsspaltung durch die Restriktionsendonuklease *AvaII* eine Methode unabhängig von der Sequenzanalyse gewählt. Die p.M390R-Mutation konnte mit einer Allelhäufigkeit von 10% in dem untersuchten Patientengut gefunden werden und bestätigt somit das Ergebnis internationaler Studien.

Studien internationaler Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass BBS-Patienten auch Mutationen in *BBS6* tragen. Das *BBS6*-Gen des vorhandenen Patientenkollektivs (n=62) wurde auf Sequenzvarianten analysiert. Die Methode der single-strand conformational analysis (SSCA) diente für die DNA-Proben unserer 62 BBS-Patienten als Vorscreen für Sequenzvarianten. Die Sequenzanalyse von 20 bei der SSC-Analyse auffälligen DNA-Proben zeigte vier Sequenzvarianten. Zwei der Sequenzvarianten liegen in *BBS6* Exon 3 (p.Y37C und p.I178I) und zwei in *BBS6* Exon 6 (p.R517C und p.G532V). Alle Sequenzvarianten sind bereits in der Literatur beschrieben worden. Wir vermuten, dass die Aminosäureaustauschmutationen p.Y37C und p.G532V krankheitsauslösend sind. Die Mutation p.Y37C wurde bei zwei BBS-Patienten (n=2/62) gefunden. Die Mutation p.G532V wurde bei den zwei identischen BBS-Patienten (n=2/62) nachgewiesen. Bei der p.I178I-Mutation handelt es sich um eine stille Mutation, die zwar einen Basenaustausch in der DNA, aber keinen Aminosäureaustausch im Protein verursacht. Die p.I178I-Mutation wurde bei zwölf der 62 BBS-Patienten (n=12/62) gefunden. Die Sequenzvariante p.R517C ist ein Polymorphismus, der in dem von uns untersuchten Patientenkollektiv bei acht BBS-Patienten (n=8/62) nachgewiesen wurde. Die Häufigkeit von 13% der p.R517C-Mutation in unserem Patientenkollektiv bestätigt internationale Studienergebnisse.

In der internationalen Literatur werden neben BBS-Patienten mit Mutationen in nur einem BBS-Gen (monogen) auch BBS-Patienten mit Kombinationen von Mutationen in zwei verschiedenen BBS-Genen beschrieben (digen), insbesondere von Kombinationen der p.M390R-Mutation in *BBS1* mit einer Mutation in *BBS6*. BBS-Patienten mit Mutationen in der Kombination p.M390R in *BBS1* mit einer Mutation in *BBS6* konnten in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Die Sequenzanalysen in *BBS6* der BBS-

Patienten mit der p.M390R-Mutation waren unauffällig. Ob BBS-Patienten unseres Patientenkollektivs möglicherweise digen von einer anderen als der p.M390R-Mutation in *BBS1* mit Mutationen in *BBS6* betroffen sind bleibt offen, da diese Studie die BBS-Patienten nur auf die p.M390R-Mutation in *BBS1* analysiert hat.

Die alleinige Existenz eines klassisch autosomal-rezessiven Erbganges bei BBS muss bezweifelt werden. Aktuell muss von einem oligogenen Erbgang ausgegangen werden. Routinemäßig werden BBS-Patienten nur auf die p.M390R-Mutation in *BBS1* getestet. Somit ist der praktizierende Arzt hauptsächlich mit BBS-Patienten konfrontiert, die Träger der p.M390R-Mutation sind. Die Erhebung des Stammbaums und die Genotypisierung möglichst vieler Familienmitglieder sollte zeigen können, ob bei der zu beratenden Familie ein klassisch autosomal-rezessiver Erbgang vorliegt. Ist dies der Fall ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Kind von heterozygoten Mutationsträgern der p.M390R-Mutation am BBS erkrankt mit 25% anzugeben. Die Wahrscheinlichkeit, gesunder heterozygoter Träger der p.M390R-Mutation mit einem Partner, der den homozygoten Wildtyp trägt, erkrankte Kinder zu bekommen, ist als weit unter 1% einzustufen.

7 Abkürzungen und Symbole

7.1 Abkürzungen





Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
Acc.No.	Identifikationsnummer der Genbank
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ARL6	ADP-ribolysation-factor-like-6
AS	Aminosäure
<i>AvaII</i>	<i>Anabaena variabilis</i> II
BBS	Bardet-Biedl-Syndrom
<i>BBS</i>	BBS-Gen
BBS-Patient	Eine Person, bei der nach klinischen Kriterien BBS diagnostiziert wurde.
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaar(e)
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane regulator
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
$E_{260/280}$	Extinktion bei 260/280 nm Wellenlänge
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Forward
HGMP	Human Genome Mapping Project Resource
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HUGO	Human Genome Project
kb	Kilobasen
LMBBS	Laurence-Moon-Bardet-Biedl-Syndrom
LMS	Laurence-Moon-Syndrom

l.o.	Links oben
l.u.	Links unten
M	Molar
MKKS	McKusick-Kaufman-Syndrom
n	Stichprobenumfang
nd	Nicht getestet
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center of Biotechnology Information
<i>NspI</i>	Nostoc species I
OGT	O-N-Acetylglucosamintransferase
Oligo(s)	Oligonukleotid(e)
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
p	französisch: petit, kurzer Arm eines Chromosoms
PAA	Polyacrylamid
PAP	Postaxiale Polydaktylie
PCR	Polymerase Chain Reaction
q	französisch: queue, langer Arm eines Chromosoms
R	Reverse
RCLB	Red Cell Lysis Buffer
Rebase	Restriction Enzyme Database
r.o.	Rechts oben
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SSCA	Single-strand conformational analysis
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	Polymerase isoliert aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED p.a.	Tetramethyldiamid gelöst
TPE	Tris-Phosphorsäure-EDTA
TTC8	Tetratricopeptid-repeat-domain 8




U	Units
UCSC	University of California Santa Cruz
wt	Wildtyp-Allel
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent

7.2 Symbole

7.2.1 Stammbaumsymbole

	männliche Person, nicht betroffen		männliche Person, am BBS erkrankt
	weibliche Person, nicht betroffen		weibliche Person, am BBS erkrankt

7.2.2 Symbole zur Beschreibung des Genotyps

	homozygote(r) TrägerIn des Wildtyps
	heterozygote(r) TrägerIn einer Mutation
	homozygote(r) TrägerIn einer Mutation

8 Literaturverzeichnis

- Andersen KL, Echwald SM, Larsen LH, Hamid YH, Glumer C, Jorgensen T, Borch-Johnsen K, Andersen T, Sorensen TI, Hansen T, Pedersen O (2005) Variation of the McKusick-Kaufman gene and studies of relationships with common forms of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 90:225-30
- Ansley SJ, Badano JL, Blacque OE, Hill J, Hoskins BE, Leitch CC, Kim JC, Ross AJ, Eichers ER, Teslovich TM, Mah AK, Johnsen RC, Cavender JC, Lewis RA, Leroux MR, Beales PL, Katsanis N (2003) Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 425:628-33
- Badano JL, Ansley SJ, Leitch CC, Lewis RA, Lupski JR, Katsanis N (2003) Identification of a novel Bardet-Biedl syndrome protein, BBS7, that shares structural features with BBS1 and BBS2. *Am J Hum Genet* 72:650-8
- Bardet G (1920) Sur un syndrome d'obesite infantile avec polydactylie et retinite pigmentaire (contribution a l'etude des formes cliniques de l'obesite hypophysaire). Thesis: Paris 479
- Beales PL, Badano JL, Ross AJ, Ansley SJ, Hoskins BE, Kirsten B, Mein CA, Froguel P, Scambler PJ, Lewis RA, Lupski JR, Katsanis N (2003) Genetic interaction of BBS1 mutations with alleles at other BBS loci can result in non-Mendelian Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet* 72:1187-99
- Beales PL, Elcioglu N, Woolf AS, Parker D, Flinter FA (1999) New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *J Med Genet* 36:437-46
- Beales PL, Katsanis N, Lewis RA, Ansley SJ, Elcioglu N, Raza J, Woods MO, Green JS, Parfrey PS, Davidson WS, Lupski JR (2001) Genetic and mutational analyses of a large multiethnic Bardet-Biedl cohort reveal a minor involvement of BBS6 and delineate the critical intervals of other loci. *Am J Hum Genet* 68:606-16
- Biedl A (1922) Ein Geschwisterpaar mit adiposo-genitaler Dystrophie. *Dtsch. Med. Wschr.* 48
- Bruhl P, Schwanitz G, Mallmann R, Muller SC, Raff R (2001) [Bardet-Biedl syndrome: aspects of nephro-urology and human genetics]. *Klin Padiatr* 213:8-12
- David A, Bitoun P, Lacombe D, Lambert JC, Nivelon A, Vigneron J, Verloes A (1999) Hydrometrocolpos and polydactyly: a common neonatal presentation of Bardet-Biedl and McKusick-Kaufman syndromes. *J Med Genet* 36:599-603
- Fan Y, Rahman P, Peddle L, Hefferton D, Gladney N, Moore SJ, Green JS, Parfrey PS, Davidson WS (2004) Bardet-Biedl syndrome 1 genotype and obesity in the Newfoundland population. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:680-4

- Farag TI, Teebi AS (1988) Bardet-Biedl and Laurence-Moon syndromes in a mixed Arab population. *Clin Genet* 33:78-82
- Farag TI, Teebi AS (1989) High incidence of Bardet Biedl syndrome among the Bedouin. *Clin Genet* 36:463-4
- Gaucherand P, Vavasseur-Monot C, Ollagnon E, Boisson C, Labaune JM, Basset T, Yared G (2002) McKusik-Kaufman syndrome: prenatal diagnosis, genetics and follow up. *Prenat Diagn* 22:1048-50
- Green JS, Parfrey PS, Harnett JD, Farid NR, Cramer BC, Johnson G, Heath O, McManamon PJ, O'Leary E, Pryse-Phillips W (1989) The cardinal manifestations of Bardet-Biedl syndrome, a form of Laurence-Moon-Biedl syndrome. *N Engl J Med* 321:1002-9
- Hundrieser J, Bremer S, Peinemann F, Stuhmann M, Hoffknecht N, Wulf B, Schmidtke J, Reiss J, Maass G, Tummler B (1990) Frequency of the F508 deletion in the CFTR gene in Turkish cystic fibrosis patients. *Hum Genet* 85:409-10
- Katsanis N (2004) The oligogenic properties of Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1:R65-71
- Katsanis N, Ansley SJ, Badano JL, Eichers ER, Lewis RA, Hoskins BE, Scambler PJ, Davidson WS, Beales PL, Lupski JR (2001a) Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science* 293:2256-9
- Katsanis N, Beales PL, Woods MO, Lewis RA, Green JS, Parfrey PS, Ansley SJ, Davidson WS, Lupski JR (2000) Mutations in MKKS cause obesity, retinal dystrophy and renal malformations associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 26:67-70
- Katsanis N, Eichers ER, Ansley SJ, Lewis RA, Kayserili H, Hoskins BE, Scambler PJ, Beales PL, Lupski JR (2002) BBS4 is a minor contributor to Bardet-Biedl syndrome and may also participate in triallelic inheritance. *Am J Hum Genet* 71:22-9
- Katsanis N, Lupski JR, Beales PL (2001b) Exploring the molecular basis of Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet* 10:2293-9
- Kaufman RL, Hartmann AF, McAlister WH (1972) Family studies in congenital heart disease, II: A syndrome of hydrometrocolpus, postaxial polydactyly and congenital heart disease. *Birth Defects Orig Artic Ser* VIII(5):85-86
- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245:1073-80

- Laurence JZ, Moon RC (1866) Four cases of "retinitis pigmentosa" occurring in the same family, and accompanied by general imperfections of development. *Ophthalmol Rev* 2:32-41
- McKusick VA, Bauer RL, Koop CE, Scott RB (1964) Hydrometrocolpos as a Simply Inherited Malformation. *Jama* 189:813-6
- Mykytyn K, Braun T, Carmi R, Haider NB, Searby CC, Shastri M, Beck G, Wright AF, Iannaccone A, Elbedour K, Riise R, Baldi A, Raas-Rothschild A, Gorman SW, Duhl DM, Jacobson SG, Casavant T, Stone EM, Sheffield VC (2001) Identification of the gene that, when mutated, causes the human obesity syndrome BBS4. *Nat Genet* 28:188-91
- Mykytyn K, Nishimura DY, Searby CC, Shastri M, Yen HJ, Beck JS, Braun T, Streb LM, Cornier AS, Cox GF, Fulton AB, Carmi R, Luleci G, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Jacobson SG, Heckenlively JR, Weleber RG, Stone EM, Sheffield VC (2002) Identification of the gene (BBS1) most commonly involved in Bardet-Biedl syndrome, a complex human obesity syndrome. *Nat Genet* 31:435-8
- Mykytyn K, Sheffield VC (2004) Establishing a connection between cilia and Bardet-Biedl Syndrome. *Trends Mol Med* 10:106-9
- Nishimura DY, Searby CC, Carmi R, Elbedour K, Van Maldergem L, Fulton AB, Lam BL, Powell BR, Swiderski RE, Bugge KE, Haider NB, Kwitek-Black AE, Ying L, Duhl DM, Gorman SW, Heon E, Iannaccone A, Bonneau D, Biesecker LG, Jacobson SG, Stone EM, Sheffield VC (2001) Positional cloning of a novel gene on chromosome 16q causing Bardet-Biedl syndrome (BBS2). *Hum Mol Genet* 10:865-74
- Schachat AP, Maumenee IH (1982) The Bardet-Biedl syndrome and related disorders. *Arch Ophthalmol* 100:285-288
- Slavotinek AM, Searby C, Al-Gazali L, Hennekam RC, Schrandt-Stumpel C, Orcana-Losa M, Pardo-Reoyo S, Cantani A, Kumar D, Capellini Q, Neri G, Zackai E, Biesecker LG (2002) Mutation analysis of the MKKS gene in McKusick-Kaufman syndrome and selected Bardet-Biedl syndrome patients. *Hum Genet* 110:561-7
- Slavotinek AM, Stone EM, Mykytyn K, Heckenlively JR, Green JS, Heon E, Musarella MA, Parfrey PS, Sheffield VC, Biesecker LG (2000) Mutations in MKKS cause Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 26:15-6
- Solis-Cohen S, Weiss E (1925) Dystrophia adiposogenitalis with atypical retinitis pigmentosa and mental deficiency: the Laurence-Biedl syndrome. *Am J Med Sci* 169:489-505

- Stone DL, Slavotinek A, Bouffard GG, Banerjee-Basu S, Baxevasis AD, Barr M, Biesecker LG (2000) Mutation of a gene encoding a putative chaperonin causes McKusick-Kaufman syndrome. *Nat Genet* 25:79-82
- Teebi AS (1994) Autosomal recessive disorders among Arabs: an overview from Kuwait. *J Med Genet* 31:224-33

9 Anhang

9.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren:

Alfke	Hasilik	Maisch	Seitz
Arnold	Hassan	Moll	Seyberth
Aumüller	Hermann-Lingen	Mueller	Steininger
		Mutters	Stiletto
Basler	Kill		
Baum	Klenk	Neubauer	Vogelmeyer
Becker	Klose		
Boudriot	Koch	Oertel	Weihe
	Koolmann		Werner
Cetin	Krieg	Remschmidt	Wulf
Czubayko	Kuhlmann	Renz	
	Kroll	Richter	
Daut	Kunz	Rieder	
		Röper	
Gerdes	Lenz	Rothmund	
Görg	Lill		
Griss	Löffler	Schnabel	
Grzeschik	Lohoff	Schrader	

9.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. K.-H. Grzeschik möchte ich für die Möglichkeit danken, dass ich diese Arbeit am Zentrum für Humangenetik in Marburg durchführen konnte.

Frau Prof. Dr. Manuela C. Koch gilt mein besonderer Dank für die interessante Themenstellung und der großartigen Betreuung dieser Arbeit. Die ständige Diskussionsbereitschaft und die sehr zügigen und kritischen Durchsichten meiner Manuskripte haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Gerti danke ich für die Einarbeitung, die tägliche unermüdliche Unterstützung sowie dem angenehmen, freundschaftlichen und liebevollen Umgang während dieser Arbeit im Labor. Frau Dorothea Bornholdt danke ich für die nützlichen Tipps bei der Durchführung der SSC-Analysen.

Bei Herrn Kai Nagel, Frau Julia Kersten und Frau Daniela Lerche möchte ich mich für die Einarbeitung in die Methoden bedanken. Herrn Mathäus Lis und Frau Katharina Obst danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der SSCA-Gele. Frau Helene Claus danke ich für die nette Zusammenarbeit bei der Zusammenstellung der gesammelten Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe.

Frau Dr. Leonora Leveleki, Herrn Jörg Schott und meinem Onkel Herrn Lothar Roth-Augner möchte ich für die Durchsicht und für die ehrliche Kritik danken. Lothar danke ich zusätzlich für die Hilfestellung bei der Datenverarbeitung. Herrn Priv. Doz. Dr. Jürgen Kunz danke ich für die Hilfe bei der Auswertung der Sequenzanalysen.

Ich danke den PatientInnen für die Teilnahme an dieser Studie und Frau Kellermann von der Laienorganisation Pro Retina Deutschland e.V. bzw. deren Untergruppe „BBS“ für ihre Kooperation.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Sie ermöglichen mir das Studium und sind treue, freundschaftliche und vorbildliche Wegbegleiter, die mir jederzeit zur Seite stehen. Meiner Freundin Olga danke ich für den Anstoß diese Doktorarbeit zu beginnen und die Motivation diese Arbeit zu beenden. Ich danke ihr für ihre Unterstützung, ihre Aufmunterungen und für ihr Interesse. Ihr und unserem Sohn Fabian danke ich für den verständnisvollen Verzicht während dieser Arbeit.